

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL – UFMS
Campus de CAMPO GRANDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR – PMBqBM - SBBq

LUIZA CALASTRO CARNEIRO

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO MUCO E DA PEÇONHA
DE *Potamotrygon motoro***

Campo Grande - MS

Março/2024

LUIZA CALASTRO CARNEIRO

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO MUCO E DA PEÇONHA
DE *Potamotrygon motoro***

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências, área de Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Malson Neilson de Lucena

Campo Grande - MS

Março/2024

Ficha catalográfica com os dados fornecidos pela autora

Carneiro, Luiza Calastro Carneiro.

Caracterização Bioquímica do Muco e da Peçonha de *Potamotrygon motoro*

/ Luiza Calastro Carneiro; Orientador Malson Neilson de Lucena. —Campo Grande, 2024.

93p.

Dissertação (Mestrado – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em
Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2024.

1.Peixes peçonhentos. 2.Peptídeo. 3.Perfil proteico

TERMO DE APROVAÇÃO

LUIZA CALASTRO CARNEIRO

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO MUCO E DA PEÇONHA
DE *Potamotrygon motoro***

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

_____ de _____ de 2024

Comissão Examinadora:

Malson Neilson de Lucena

UFMS

Suely Gomes Figueiredo

UFES

Renata Santos Rodrigues

UFU

"Dedico este trabalho à coragem escondida em cada um de nós, aqueles que, apesar do peso das expectativas e da pressão externa, encontram a força para superar o medo de tentar. Que este trabalho sirva como um lembrete de que nossa luz interior é mais forte do que as sombras que às vezes nos cercam."

*"Na imensidão do desconhecido,
cada descoberta é uma luz que desvenda
os mistérios da vida e da natureza."*

Marie Curie

AGRADECIMENTOS

Ao chegar ao final desta etapa tão importante da minha jornada acadêmica, gostaria de expressar minha mais sincera gratidão a todos aqueles que tornaram possível a realização desta dissertação.

Em primeiro lugar, meu profundo agradecimento ao meu orientador, Malson Neilson de Lucena, cujo conhecimento e orientação foram fundamentais para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho, principalmente sua ENORME paciência para desenvolver todas as minhas “ideias macarrônicas”. Sei que não sou fácil de lidar ainda mais com os meus mini surtos a cada 2 dias. Seu apoio inestimável e suas críticas construtivas foram essenciais para que eu pudesse superar os desafios enfrentados ao longo desta jornada.

Agradeço também aos membros da banca examinadora do exame de qualificação, Alda Ferreira, Guilherme Rabelo Coelho e Suely Gomes Figueiredo por suas valiosas sugestões e comentários, que enriqueceram significativamente este trabalho. Sua expertise e perspectivas foram cruciais para aprimorar a qualidade da minha pesquisa. Também agradeço a Renata Santos Rodrigues pela participação na banca de defesa.

Especialmente, gostaria de dedicar um parágrafo para agradecer ao Mateus Diniz Gottardi, que esteve ao meu lado em cada passo desta jornada. Seu apoio, compreensão e amor incondicional foram pilares em momentos de dúvida e cansaço. Você foi mais do que um parceiro; foi um confidente, um motivador e, acima de tudo, uma fonte constante de alegria e paz. Sua fé inabalável em minha capacidade e seu encorajamento constante me inspiraram a perseguir meus sonhos com determinação. Por tudo isso e muito mais, sou eternamente grata.

Não posso prosseguir sem dedicar uma parte especial deste agradecimento à minha família, cuja importância em minha jornada até este ponto não pode ser subestimada. A vocês, que me proporcionaram não apenas as raízes de onde venho, mas também as asas para voar, meu mais profundo respeito e amor em especial meus pais Elisandra Frederico Calastro Carneiro e Louremir Luciano Carneiro Júnior. Sempre valorizaram a educação e me ensinaram a nunca desistir dos meus sonhos, independentemente das adversidades. Sua força e sabedoria foram minha inspiração diária. Esta conquista é tão sua quanto minha, pois sem vocês, eu não estaria onde estou hoje. Seu amor incondicional, paciência e apoio foram os pilares que me sustentaram e me guiaram até

este momento de celebração. Com todo o meu amor e gratidão, dedico este sucesso a vocês, minha querida família.

Aos meus amigos de laboratório, obrigada por todos os momentos de descontração, pelas informações edificadoras e principalmente todo o apoio na desenvoltura dos experimentos. Amo muito o nosso grupo “toxiners”, combina com a personalidade de cada um. Gostaria de agradecer em especial a Alynne Coelho Ribeiro, sua amizade foi um pilar de apoio em minha vida.

Um agradecimento especial à UFMS, por proporcionar as condições necessárias para o desenvolvimento desta pesquisa, assim como aos professores e colegas do programa de Bioquímica e Biologia Molecular, pela troca de ideias e pelo ambiente acadêmico estimulante. Aos órgãos de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior por apoiar e ceder recursos para a realização desta pesquisa, e especialmente à CAPES.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Cada um de vocês deixou uma marca valiosa nesta jornada, e sou profundamente grata por isso.

RESUMO

No Brasil, os acidentes com peixes peçonhentos estão se tornando cada vez mais frequentes, isso se deve às atividades exercidas na água por populações ribeirinhas, como a pesca, lavagem de roupas e utensílios, além do próprio lazer. As arraias são peixes cartilagosos, que estão presentes tanto em rios como em mares. Elas apresentam uma cauda contendo um ferrão, que rapidamente é introduzido no corpo da vítima, quando essa estabelece contato acidentalmente em seu dorso. Os acidentes com as arraias de água doce podem desencadear uma série de reações inflamatórias, assim como edemas e dermonecrose, devido a presença de toxinas na composição da peçonha. Cada um dos componentes atua de uma maneira diferenciada, resultando em atividades miotóxicas, neurotóxicas, agregações plaquetárias, entre outras. O muco é uma fonte inexplorada de peptídeos antimicrobianos, estudos comprovaram a existência de PAMS (Peptídeos Antimicrobianos) que apresentam atividades contra agentes patogênicos. A arraia *Potamotrygon motoro* ocorre na bacia do Paraná-Paraguai e Tocantins e apresenta uma coloração dorsal castanho claro e ocelos bicolors. Esse trabalho teve como objetivo a caracterização bioquímica da peçonha e do muco da arraia *Potamotrygon motoro*. As arraias utilizadas foram doadas pelo Bioparque Pantanal. Foram realizadas diferentes eletroforeses como SDS-PAGE, nativa e para proteínas de baixa massa molecular, com o intuito de avaliar o perfil proteico do extrato do muco e do ferrão dessa espécie. O perfil proteico do extrato do muco também foi analisado por HPLC. Foi identificada, nos extratos do muco e do ferrão, uma banda de massa molecular de aproximadamente 75 kDa, massa semelhante a uma banda de 79 kDa identificada em outro trabalho como uma hialuronidase. Também foi possível visualizar bandas com massa molecular menores que 15 kDa, tanto no extrato do muco quanto do ferrão sugerindo a presença de peptídeos. Por meio da análise em HPLC do extrato proteico do muco, constatou a presença de um composto de natureza hidrofílica, possivelmente um peptídeo (pico 1), esse pico revelou-se ser predominante na amostra. Além disso, outros 8 picos menos abundantes puderam ser observados no perfil cromatográfico do extrato proteico do muco. Este é o primeiro trabalho mostrando o perfil cromatográfico da *Potamotrygon motoro*. Pode-se observar que o perfil proteico dos extratos da peçonha e do muco são relativamente semelhantes, o que sugere novos estudos para identificar os motivos dos acidentes com peçonha provocarem um agravamento clínico mais severo que os acidentes com o muco.

Palavras-chaves: Arraia; Peptídeos; Peçonha; Muco

ABSTRACT

In Brazil, accidents involving venomous fish are becoming increasingly frequent, due to activities carried out in the water by riverside populations, such as fishing, washing clothes and utensils, as well as leisure activities. Stingrays are cartilaginous fish, present in both rivers and seas. They have a tail containing a sting, which is quickly inserted into the victim's body when accidental contact is made with their back. Accidents with freshwater stingrays can trigger a series of inflammatory reactions, as well as edema and dermonecrosis, due to the presence of toxins in the venom composition. Each of these components acts in a differentiated manner, resulting in myotoxic, neurotoxic activities, platelet aggregations, among others. Mucus is an unexplored source of antimicrobial peptides; studies have proven the existence of AMPs that present activities against pathogenic agents. The stingray *Potamotrygon motoro* occurs in the Paraná-Paraguay and Tocantins basins and it has a light brown dorsal coloration and bicolored ocelli. This work aimed at the biochemical characterization of the venom and mucus of the stingray *Potamotrygon motoro*. The stingrays used were donated by the Bioparque Pantanal. Different electrophoresis were performed in order to evaluate the protein profile of this species, including polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electrophoresis for low molecular weight proteins. In the extracts of the mucus and the sting, a band with a molecular mass of approximately 75 kDa was identified, similar to a 79 kDa band identified in another work with a hyaluronidase. Bands below 15 kDa can also be seen, in both the mucus and sting extracts suggesting peptides. Through HPLC analysis of the protein extract of the mucus, the presence of a hydrophilic compound, possibly a peptide (peak 1), was noted; this peak turned out to be predominant in the sample. Moreover, 8 less abundant peaks could be observed in the chromatographic profile of the protein extract of the mucus. This is the first work showing the chromatographic profile of *Potamotrygon motoro*. It can be observed that the protein profiles of the venom and mucus extracts are relatively similar, which suggests new studies to identify the reasons for the venom presenting a more severe worsening than the mucus.

Keywords: Sintray; Peptides; Venom; Mucus.

SUMÁRIO

1.JUSTIFICATIVA.....	16
2.OBJETIVOS.....	18
2.1Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1 Biologia das arraias.....	19
3.2 Potamotrygon motoro.....	27
3.3 Acidentes por peixes.....	28
3.4 Peçonha de animais aquáticos.....	39
3.5 Peptídeos antimicrobianos.....	43
4-MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1-Coleta dos animais.....	46
4.2-Obtenção e processamento do extrato proteico do ferrão.....	46
4.3-Obtenção e processamento do extrato proteico do muco.....	47
4.4-Dosagem de proteínas dos extratos protéicos.....	47
4.5-Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	47
4.5.1 Preparo das amostras para eletroforese.....	47
4.5.2- Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	47
4.5.3-Eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas de baixa massa molecular: Método de SHÄGGER & JAGOW (1987).....	48
5. Secagem do gel.....	49
6.Perfil cromatográfico da peçonha.....	49
5-RESULTADOS.....	50
5.1.Dosagem de proteínas do extrato proteico do muco e do ferrão.....	50
5.2.Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	50
5.3.Eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas de baixa massa molecular.	54
6-DISCUSSÃO.....	57
7-CONCLUSÃO.....	64
8-REFERÊNCIAS.....	65

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Exemplar de arraia <i>Potamotrygon leopoldi</i> . A seta indica a localização do ferrão.....	21
FIGURA 2: (A) Morfologia da arraia, vista dorsal. 1- olhos, 2-espíráculo, 3-nadadeira peitoral, 4-nadadeira pélvica, 5-ferrão, 6-cauda. (B) Morfologia da arraia, vista ventral. 1- pares de fendas branquiais (5), 2-boca, 3-nadadeiras pélvicas..	22
FIGURA 3 : Locais com ocorrência de arraias ao longo do terço inicial do Rio Tietê.	24
FIGURA 4: Espécimes dos 4 gêneros de arraias de água doce encontrados no Brasil: <i>Paratrygon aiereba</i> (A); <i>Plesiotrygon iwamae</i> (B); <i>Potamotrygon motoro</i> (C); <i>Heliotrygon gomesi</i> (D).....	26
FIGURA 5: Morfologia do ferrão. Seta indica a bainha do tegumento que recobre o ferrão. A figura ampliada é a vista do ferrão retrosserilhado.....	28
FIGURA 6: A-Histologia do ferrão. Corte transversal do ferrão, onde * representam as células especializadas produtoras de peçonha na epiderme (E), ao redor de todo o ferrão, MR-região mineralizada. B-Amplificação da região ventrolateral do ferrão, representada pelo quadrado na figura A. Células especializadas representadas por * estão espalhadas em diversas camadas. A seta aponta para uma célula glandular em posição apical, entre as células epidérmicas comuns.....	29
FIGURA 7: Estrutura da ciguatoxina.....	32
FIGURA 8: Estrutura da tetrodotoxina.....	34
FIGURA 9: As duas espécies são extremamente semelhantes, a única diferença é a distribuição dos espinhos dorsais. A esquerda a foto representa a espécie <i>Logocephalus lunaris</i> (não comestível) e a direita representa <i>Logocephalus spadiceus</i> (comestível).....	34
FIGURA 10: Relação dos acidentes causados por animais aquáticos entre os estados Brasileiros (2007-2013).....	40
FIGURA 11: Primeiros socorros, como reconhecer e tratar acidentes com peixes peçonhentos.....	41
FIGURA 12: Espécime da arraia <i>Potamotrygon motoro</i> doação do Bioparque Pantanal, Campo Grande/MS.....	53
FIGURA 13: Perfil protéico do extrato do muco em SDS-PAGE. Gel de poliacrilamida 12%. Da esquerda para a direita tem-se respectivamente S1(25µg), S2 (25µg) e S1(50µg).....	58
FIGURA 15: Perfis protéicos dos extratos do muco e ferrão em SDS-PAGE. (A)- Gel de poliacrilamida 15% corado com Coomassie, da esquerda para a direita tem-se respectivamente S1; S2; e F1. Foi utilizado 50 µg de proteína (B)- Gel de poliacrilamida 15%, da esquerda para a direita tem-se respectivamente F, S1 e S2. F (10µg e 15µg); S1 (10µg e 15µg) e S2 (10µg e 15µg).....	60
FIGURA 17: Perfil do extrato proteico da peçonha da arraia <i>Potamotrygon motoro</i> . Gel de poliacrilamida 15%, sendo da esquerda para a direita o marcador (M) e duas amostras do ferrão (F) em 10µg e 15µg de proteína.....	62

FIGURA 19: Avaliação do perfil eletroforético do extrato proteico do muco e do ferrão em SDS-PAGE sistema tricina, da arraia *Potamotrygon motoro* (A)- Gel de poliacrilamida 16,5% corado com prata. Da esquerda para a direita, temos respectivamente o extrato proteico do muco pool (S1+S2) , marcador (M) e ferrão. (B)- Gel de poliacrilamida 16,5% corado com Coomassie. Da esquerda para a direita temos respectivamente o extrato proteico do muco pool, marcador (M) e ferrão. As amostras estão na presença do agente redutor..... 64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Acidentes por animais aquáticos registrados no SINAN, Brasil, 2007-2013.....	35
--	----

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: espécies de peixes e seus respectivos peptídeos antimicrobianos.	43
QUADRO 2: Relação de espécies de arraias e suas respectivas atividades contra patógenos.....	44
QUADRO 3: Relação das espécies com as atividades proteolíticas.....	61
QUADRO 4: Relação das bandas.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau celsius
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FACFAN	Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição
g	Gravidade
HeLa	Linhagem celular de carcinoma cervical
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IgG	Imunoglobulina
K +	Íon potássio
kDa	Quilo Dalton
LPPFB	Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas
mAU	Miliunidades de Absorbância
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
MS	Mato Grosso do Sul
MUFA	Ácidos graxos monoinsaturados
Na+	Íon sódio
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PAMs	Peptídeos antimicrobianos
PLA2	Fosfolipases da família A2
pH	Potencial de hidrogênio iônico
PR	Paraná
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFA	Ácidos graxos saturados
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNAAs	Sistema de Notificação específico para Acidentes por Arraias
SP	São Paulo

Sp-CTX	Toxina do peixe-escorpião
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TTX	Tetrodontoxina
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
µg	Micrograma
µL	Microlitro

1. JUSTIFICATIVA

Existem animais que são conhecidos popularmente como animais venenosos, esses apresentam capacidade de acumulação, produção, secreção e inoculação de substâncias tóxicas. Entretanto, existe uma diferença entre os termos venenoso e peçonhento, sendo que os animais venenosos utilizam sua toxina para se defenderem contra outros predadores, diferente da peçonha, que é diretamente inoculada no corpo de outros animais tanto para defesa quanto para predação. O veneno e a peçonha, de uma maneira geral, são compostos por substâncias que apresentam efeitos nocivos sobre os seres vivos e estas substâncias são denominadas de toxinas. Além disso a maioria dos animais venenosos obtém o veneno a partir da ingestão de outros animais, microrganismos e até mesmo plantas, enquanto animais peçonhentos apresentam células especializadas na produção de toxinas, além da presença de um aparato inoculador como presas (serpentes), quelíceras (aranhas), ferrão (araias/abelhas/escorpiões) (BRASIL, 2009; COTTA, 2014; BUTANTAN, s/d).

As arraias são peixes cartilagosos classificados como peçonhentos, que são encontradas tanto em água salgada como em água doce (CARVALHO e LOVEJOY, 2011). Arraias *Potamotrygon motoro* apresentam uma morfologia bem típica: coloração marrom ou cinza e vários ocelos tricolores distribuídos por todo o seu dorso. Nos ocelos a primeira mancha central é amarela recoberta por uma mancha laranja, formando um anel, e por fim, mais uma mancha, só que dessa vez preta, intensificando a demarcação destas formando realmente anéis (LOBODA, 2006).

Os relatos sobre os acidentes ocasionados por arraias de água doce são comuns, principalmente envolvendo os pescadores. Os acidentes podem ser graves, impedindo que eles retornem ao trabalho em um curto período de tempo, ou seja, pode demorar de semanas a meses para que as vítimas consigam se recuperar das lesões, podendo o envenenamento por arraias ser considerado um problema de saúde pública (COSTA *et al.*, 2021). Uma ferroadada pode desencadear necrose tecidual, devido a presença de toxinas na peçonha, além da presença de bactérias que são capazes de se proliferar nos tecidos lesionados e apresentam resistência ao tratamento com antibióticos, provocando infecções secundárias (DOMINGOS *et al.*, 2011). Tanto o muco quanto o ferrão apresentam características bioquímicas diversas, que atuam auxiliando na defesa deste peixe, quando este se encontra ameaçado. Também é possível observar que a peçonha pode desencadear respostas inflamatórias assim como atividade miotóxica

(LAMEIRAS *et al.*, 2014), além da presença de hialuronidase que intensifica a difusão da peçonha no corpo da vítima (HADDAD, 2008). O tratamento dos acidentes com arraias consiste em amenizar a dor provocada pela ferroadada, geralmente o membro lesionado é mergulhado em água quente, já que os componentes da peçonha são termolábeis e perdem suas propriedades em altas temperaturas (HADDAD, 2003). Também é indicado lavar o local do ferimento em água corrente, e fazer o uso de anestésicos locais que não contenham adrenalina (GARRONE NETO e HADDAD, 2009-2010). Ainda não existem soros para o tratamento contra o envenenamento, pois a maioria dos acidentes não são reportados, inviabilizando as pesquisas em busca da soroterapia (GARRONE NETO e HADDAD JR., 2010).

De acordo com FUOCHI e colaboradores, (2017) o muco que recobre os peixes apresenta atividade microbiana contra patógenos. Um exemplo seria o muco da espécie da arraia da espécie *Dasyatis pastinaca* L., que apresenta atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida. tropicalis*. Deste modo se faz necessário mais estudos para a identificação dos componentes presentes no muco e na peçonha das arraias, visto que existem poucas pesquisas sobre estes, sendo assim uma fonte inexplorada de agentes com potenciais biotecnológicos. Este trabalho teve o propósito de investigar por meio da obtenção de perfis protéicos dos extratos do muco e da peçonha, assim como o entendimento do envenenamento e possível tratamento, além de possíveis aplicações biotecnológicas de moléculas da arraia de água doce *Potamotrygon motoro*.

2.OBJETIVOS

2.1Objetivo geral

Caracterizar bioquimicamente a peçonha e o muco da arraia *Potamotrygon motoro*.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar o perfil proteico da peçonha da arraia *Potamotrygon motoro* por:

-Eletroforese tipo SDS-PAGE e nativa

Obter o perfil proteico do muco da arraia *Potamotrygon motoro* por:

-Eletroforese tipo SDS-PAGE e nativa

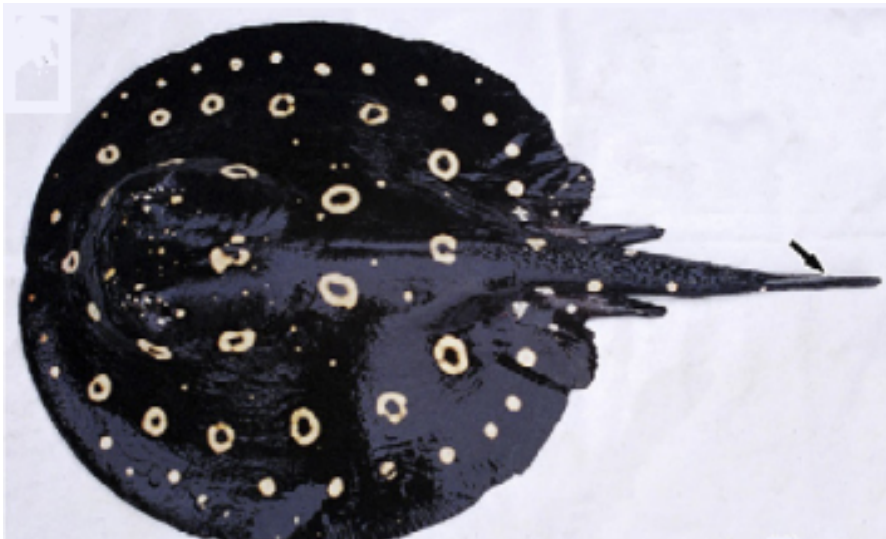
-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Biologia das arraias

As arraias apresentam um corpo achatado dorsoventralmente (FIGURA 1), nadadeiras peitorais além de uma cabeça que está inserida ao disco e assim como a boca (composta por dentes pavimentosos), as aberturas branquiais estão localizadas na face ventral.

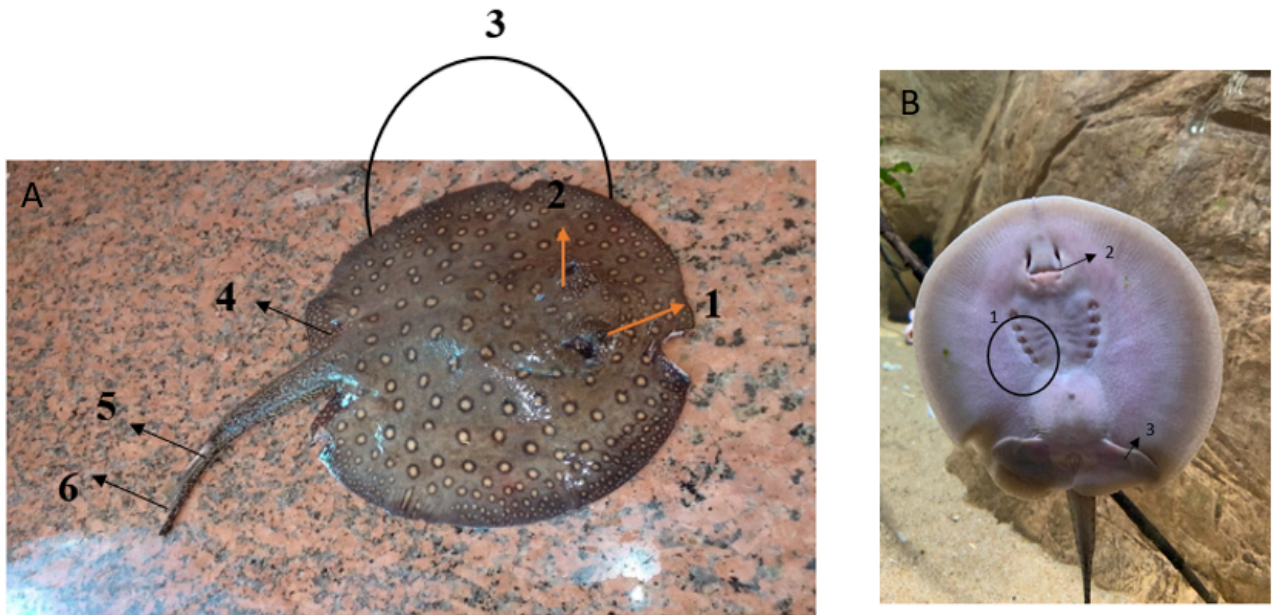
FIGURA 1: Exemplar de arraia *Potamotrygon leopoldi*. A seta indica a localização do ferrão.



Fonte: adaptado de PEDROSO *et al.*, 2007.

Com relação aos olhos, esses se encontram acima da cabeça, na região dorsal, assim como os espiráculos (FIGURA 2A). São animais vivíparos aplacentários (GARRONE NETO; HADDAD JR, 2010). Devido ao posicionamento da sua boca (FIGURA 2B), as arraias são facilmente localizadas em fundos arenosos ou lamacentos, sendo assim capazes de complementar sua dieta alimentar com insetos, crustáceos, peixes entre outros (ALMEIDA *et al.*, 2010).

FIGURA 2: (A) Morfologia da arraia, vista dorsal. 1- olhos, 2-espíráculo, 3-nadadeira peitoral, 4-nadadeira pélvica, 5-ferrão, 6-cauda. (B) Morfologia da arraia, vista ventral. 1- pares de fendas branquiais (5), 2-boca, 3-nadadeiras pélvicas.



Fonte: autora

As famílias de arraias existentes que habitam o Brasil são Dasyatidae (marinha), Gymnuridae (marinha), Myliobatidae (marinha), Rhinopteridae (marinha), Urolophidae (marinha) e Potamotrygonidae (água doce) (NUNES *et al.* 2005; SILVA, 2009; GARRONE NETO; HADDAD JR., 2010). Essa última família apresenta características biológicas modificadas, provenientes de ancestrais marinhos, já que são o único grupo apto para viver exclusivamente em água doce (THORSON *et al.*, 1978; COMPAGNO e COOK, 1995; ROSA, 1985; CARVALHO *et al.*, 2003; ARAÚJO *et al.*, 2004). Essas características consistem na presença do processo pré-pélvico, atrofia da glândula retal, além de incapacitações para a retenção de ureia e adaptações das ampolas de Lorenzini (ROSA, 1985; ARAÚJO, 2004).

Autores como BROOKS, 1992 e LOVEJOY, *et al.*, (1998; 2006), dispõem de duas teorias, que seriam capazes de explicar sobre a origem dos ancestrais marinhos das arraias. A primeira consiste na ocorrência de um fenômeno denominado de transgressão marinha, fazendo com que as arraias fossem realocadas pelo Oceano Atlântico (durante o Mioceno, 15 a 23 milhões de anos). Isso se deve a separação da Gondwana, resultando no continente sul-americano e africano, então pequenos lagos de água salina foram sendo criados. Os anos foram passando e esse sal foi se sedimentando, resultando

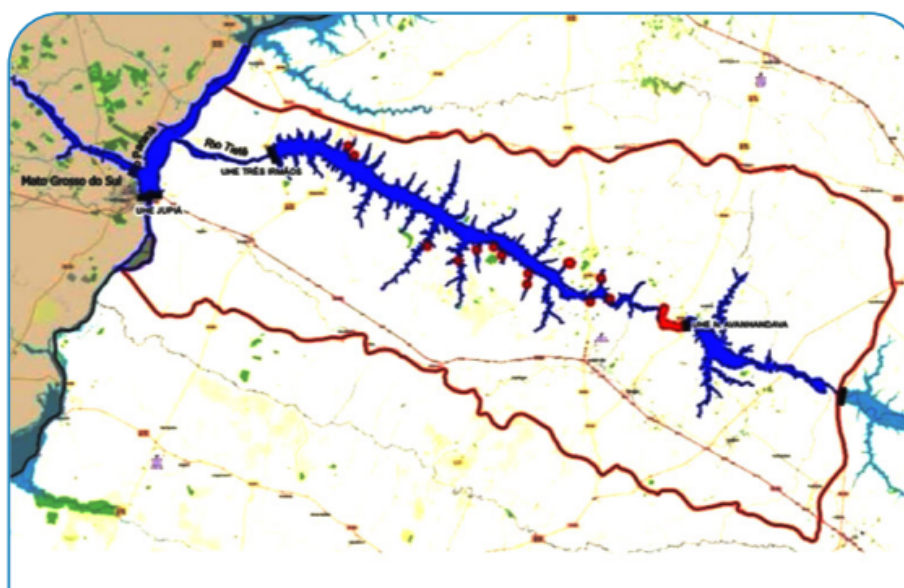
em um ambiente salobra, mas no fim a água acabou se tornando doce. Então de uma forma gradativa, ao longo dos anos as espécies foram se adaptando conforme a salinidade do meio. A segunda teoria corresponde às questões biogeográficas e filogenéticas, analisando-se os parasitas das arraias. Um estudo com base nos padrões de distribuição geográficas e relações filogenéticas dos parasitas de arraias mostrou que é possível correlacionar a filogenia do parasita e o histórico biogeográfico local, uma vez que esses parasitas, são provenientes de arraias urolofideas, que habitavam o Oceano Pacífico. Para corroborar essa teoria, foram datados fósseis da época do mioceno na porção amazônica do Peru. É notável que as arraias acabaram enclausuradas em água doce por consequência da elevação da Cordilheira dos Andes (BROOKS, 1992).

De acordo com um estudo realizado por KOLMANN e colaboradores, (2022) a primeira divisão entre as Potamotrygonidae ocorreu por volta de 28.0 milhões de anos atrás, entre os clados *Paratrygon + Heliotrygon* e *Plesiotrygon + Potamotrygon*. Depois que todos os gêneros foram constituídos, pode-se notar uma reconstrução nos estados ancestrais, apontando evidências para a especialização alimentar, no caso a piscivoria, para os ancestrais de *Paratrygon + Heliotrygon*. Alguns anos mais tarde, foi possível observar que espécies como *Potamotrygon yepezi* e *Potamotrygon magdalena* apresentaram hábitos alimentares insectívoros e consequentemente os táxons das regiões inferiores encontrados na Amazônia, que apresentavam hábitos crustáceos e moluscívoros, evoluíram para espécies conhecidas hoje como *Potamotrygon leopoldi*. Grande parte das Potamotrygonidae ancestrais eram onívoras, contudo as transições das taxas de onivoria para outras dietas ocorreu de maneira muito assimétrica. Recentemente um estudo feito por NACHTIGALL e colaboradores, (2023) consistiu na comparação entre os genomas mitocondriais de *Potamotrygon* e Batoidea, denotando um arranjo genético altamente conservado, que se assemelha ao presente em todos os outros vertebrados. Por meio de análises filogenéticas utilizando genes ribossômicos do genomas mitocondriais, foi possível constatar a monofilia do gênero *Potamotrygon* e a relação entre *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon falkneri*, sendo essas espécies responsáveis por formar um grupo irmão com *Potamotrygon magdalanae*. As semelhanças encontradas nas sequências mitocondriais corroboram com a história biogeográfica evolutiva, uma vez que *P. motoro* e *P. falkneri* compartilham duas bacias geográficas, sendo essas Paraná-Paraguai e Amazônia.

Até a década de 1970, as arraias não faziam parte da fauna aquática nativa de estados como: São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul. A barreira geográfica Sete-Quedas acabou sendo submersa, devido ao encerramento do abastecimento da reserva da Usina Hidrelétrica de Itaipu (1982), beneficiando-as de maneira que pudessem se apropriar desses canais, aumentando a sua distribuição geográfica. Como essas arraias não apresentam predadores naturais nessa área, não houve impedimentos para a sua propagação entre a porção baixa e alta do Paraná, até a foz do Rio Tietê. Existem 3 espécies precursoras que se beneficiaram desses canais: *Potamotrygon falkneri*, *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon schumacheri* (GARRONE NETO & HADDAD JR, 2010, MOREIRA e HADDAD JR, 2022). Atualmente, as arraias podem ser encontradas em São Paulo também estão presentes na Bacia do Rio Araguaia, entre os estados do Tocantins, Pará e Mato Grosso. Foram observados espécies presentes nos rios da Bacia do Plata, Rio Paraná, Província de Santa Fé e Bacia Paraná-Paraguai (HADDAD *et al.*, 2013).

Recentemente, MOREIRA e HADDAD JR, 2022, mapearam as arraias encontradas no Rio Tietê (São Paulo/Brasil). Em Buritama, as arraias foram encontradas a aproximadamente 10 km da barragem, sendo vistas também em Santo Antônio do Aracanguá, Araçatuba e Novo Horizonte. No município de Pereira Barreto, arraias foram observadas na margem da ravina e outra no leito do rio, próximo ao porto da cidade (Figura 3).

FIGURA 3 : Locais com ocorrência de arraias ao longo do terço inicial do Rio Tietê.



Fonte: adaptado de MOREIRA e HADDAD JR, 2022.

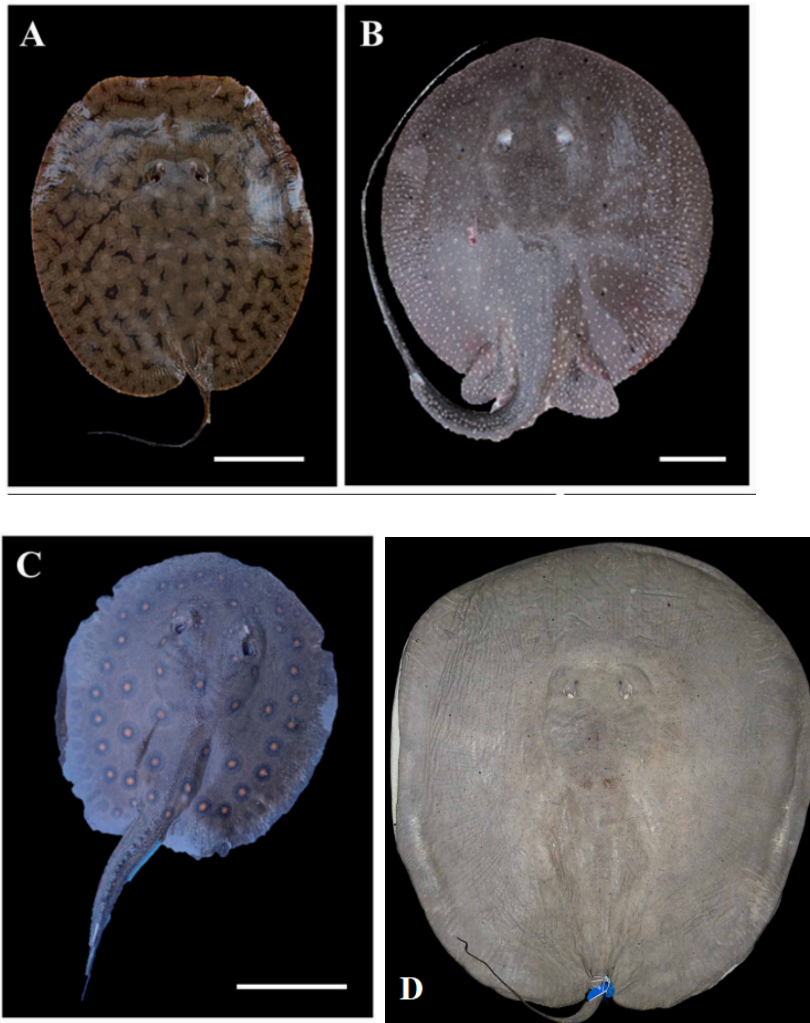
No estado de São Paulo, as arraias são predominantemente encontradas no litoral e em ambientes estuarinos, sendo os gêneros *Aetobatus*, *Dasyatis*, *Gymnura* e *Rhinoptera* os mais comuns na região. As espécies *Aetobatus* e *Rhinoptera*, são cosmopolitas e exibem comportamentos tanto bentônicos quanto pelágicos, habitando frequentemente águas costeiras superficiais onde podem ser vistas saltando fora da água e formando grupos. Notavelmente, no litoral norte de São Paulo, um estudo registrou que 80% dos 137 acidentes com esses animais foram causados por arraias do gênero *Rhinoptera* (HADDAD JR, 2008; HADDAD JR *et al.*, 2013).

Por outro lado, as arraias do gênero *Dasyatis* têm uma distribuição global e são comumente observadas em águas próximas a áreas urbanas costeiras, assim como em redes de arrasto destinadas à pesca de camarões. Estas arraias têm uma preferência por habitats mais rasos, como áreas próximas a manguezais e estuários, sendo uma característica importante para a sua localização e estudo. Na cidade de Ubatuba, localizada no interior do estado de São Paulo, foi observado que as lesões causadas por arraias do gênero *Dasyatis* afetam principalmente os pescadores, ressaltando a interação direta dessas comunidades com a fauna marinha local. Este panorama das arraias no estado de São Paulo evidencia a diversidade e complexidade dos habitats marinhos na região, bem como a importância de medidas de precaução e educação ambiental para prevenir acidentes e promover a convivência harmoniosa entre humanos e vida marinha (HADDAD JR *et al.*, 2013).

As arraias dulcícolas são peixes cartilaginosos peçonhentos da família Potamotrygonidae, classe Chondrichthyes, subclasse Elasmobranchii, ordem Myliobatiformes, agregando os gêneros (FIGURA 4): *Paratrygon*, *Potamotrygon*, *Heliotrygon* e *Plesiotrygon* (CARVALHO e LOVEJOY 2011). Estão presentes nos sistemas fluviais da América do Sul e são encontradas nas bacias Amazônica, Tocantins-Araguaia, Paraguai-Paraná e Parnaíba (GARRONE NETO *et al.*, 2007; MORO *et al.*, 2010; CARVALHO e LOVEJOY, 2011). O histórico taxonômico da família Potamotrygonidae é problemático por consequência do policromatismo do grupo, sendo que diversas espécies foram descritas em sinonímia, acarretando em diversas dúvidas e confusões. É importante ressaltar que algumas espécies foram

identificadas de acordo com exemplares antigos e até deteriorados, dificultando a sistematização do grupo (ROSA *et al.*, 2010).

FIGURA 4: Espécimes dos 4 gêneros de arraias de água doce encontrados no Brasil: *Paratrygon aiereba* (A); *Plesiotrygon iwamae* (B); *Potamotrygon motoro* (C); *Heliotrygon gomesi* (D).



Fonte: A, B e C adaptado de LAMEIRAS *et al.*, 2017. D adaptado de CARVALHO e LOVEJOY, 2011.

O gênero *Potamotrygon* abrange uma diversidade de 20 espécies de arraias. Podem ser encontrados nos países da América do Sul com exceção do Chile, nos rios Atrato e Magdalena, Amazonas e seus afluentes, presente também na bacia do Paraná-Paraguai e Tocantins (ROSA *et al.*, 2010. Sua cauda é proeminente e pequena, usualmente menor que o comprimento do disco, apresentando ferrões serrilhados em sua porção mediodistal (CARVALHO *et al.*, 2003; SILVA, 2009; GARRONE NETO;

HADDAD JR., 2010). Os indivíduos podem chegar a medir 40 cm de largura (HALSTEAD, 1966). Arraia-chicote é o nome popular da *Plesiotrygon sp.*, pois este apresenta uma cauda comprida compreendendo ferrões na porção mediana. Está presente no Pará, no Rio Tocantins, no Equador e no Rio Amazonas (ROSA *et al.*, 1987). Já a arraia-redonda, conhecida cientificamente como *Heliotrygon sp.*, é encontrada no Rio Amazonas. Apresenta um corpo circular quando comparado com os outros gêneros e seu ferrão é reduzido (CARVALHO; LOVEJOY, 2011). Por fim tendo como nome popular arraia-maçã, conhecida cientificamente como *Paratrygon sp.*, é endêmica dos rios Amazonas, Baixo Rio Tocantins, bacia do Rio Orinoco, leste do Peru e Norte da Bolívia (ROSA *et al.*, 2010). Quando jovem essas arraias apresentam uma cauda longa e quando atingem a maturidade, esta é reduzida. Seus ferrões estão localizados na base (ROSA, 1990).

É possível observar nas diferentes espécies de arraias que o seu aparelho inoculador, denominado de ferrão, é composto de um a quatro ferrões ósseos em formato retroserrilhado, podendo haver variações em sua localização na cauda, sendo definido na metade do comprimento desta, tendo como referência sua base (THORSON *et al.*, 1988). Esses ferrões são compostos por uma estrutura rígida e apresentam uma extremidade afiada, além de serem recobertos por um epitélio que é composto de células glandulares produtoras de peçonha (FIGURA 5).

FIGURA 5: Morfologia do ferrão. Seta indica a bainha do tegumento que recobre o ferrão. A figura ampliada é a vista do ferrão retrosserilhado.

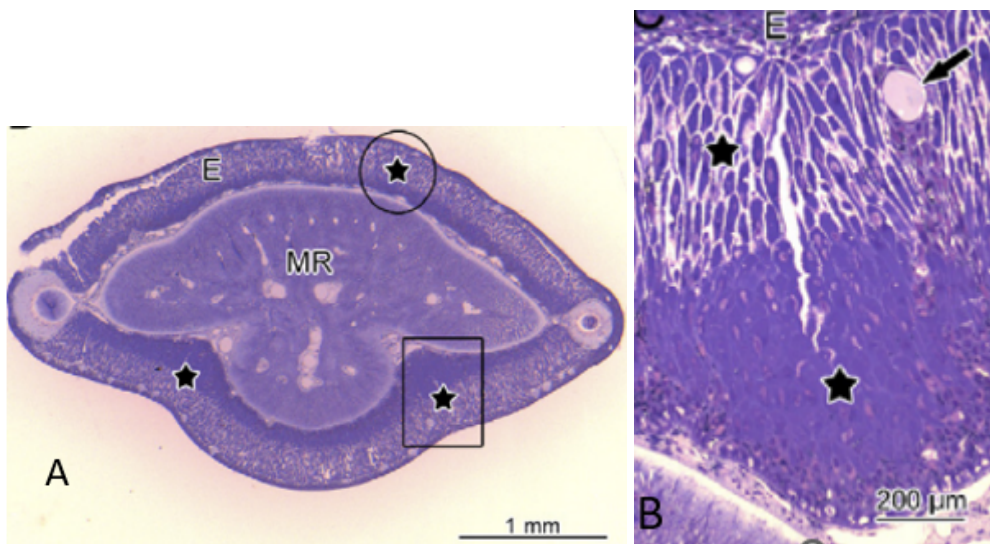


Fonte: adaptado de MOREIRA e HADDAD JR, 2022.

A princípio, estudos histoquímicos constataram a organização tissular do ferrão, como também a não existência de um sistema complexo de ductos para a injeção da peçonha, levando assim a hipótese que a inoculação da peçonha é devido a ruptura das células holócrinas (HALSTEAD, 1970 apud NETO, 2021). Posteriormente, PEDROSO *et al.*, 2007, constataram que na verdade existem células especializadas produtoras da peçonha (FIGURA 6) e que essa peculiaridade na morfologia do ferrão contribui para a penetração no corpo da vítima, intensificando o quadro clínico da lesão proveniente desse acidente. Quando ocorre a inserção do ferrão, o seu revestimento (bainha) é rompido, ocasionando a exteriorização de peçonha, ocorrendo a liberação da peçonha no organismo do indivíduo. Rapidamente, ocorre a difusão das toxinas no organismo, desencadeando todos os sintomas do envenenamento (PEDROSO *et al.*, 2007; GARRONE NETO; HADDAD JR, 2010). Além disso, é importante lembrar que o ferrão, o muco, a água e a areia, podem conter bactérias como *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Aeromonas spp.*, entre outras que implicam em infecções bacterianas, podendo resultar em processos necróticos severos. (DOMINGOS *et al.*, 2011). Em infecções bacterianas graves, os microrganismos invadem os tecidos hospedeiros, desencadeando uma resposta imunológica do hospedeiro que pode incluir a liberação de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e as

interleucinas. Essas citocinas, juntamente com a atividade direta das toxinas bacterianas, podem causar danos significativos aos tecidos, resultando em necrose. Além disso, algumas bactérias têm a capacidade de secretar enzimas e toxinas que causam lesões diretas aos tecidos. Por exemplo, as toxinas liberadas por certas cepas de *Staphylococcus aureus*, como a toxina alfa-hemolisina, podem causar lise celular e necrose em tecidos circundantes (TANG *et al.*, 2018; ABBAS *et al.*, 2020).

FIGURA 6: A-Histologia do ferrão. Corte transversal do ferrão, onde * representam as células especializadas produtoras de peçonha na epiderme (E), ao redor de todo o ferrão, MR-região mineralizada. B-Amplificação da região ventrolateral do ferrão, representada pelo quadrado na figura A. Células especializadas representadas por * estão espalhadas em diversas camadas. A seta aponta para uma célula glandular em posição apical, entre as células epidérmicas comuns.



Fonte: adaptado de PEDROSO *et al.*, 2007.

Uma análise histoquímica realizada por NETO, (2021) revelou que as células das camadas intermediárias e superficiais do tecido epitelial localizado no dorso de *Potamotrygon rex* desempenham um papel essencial na geração do muco. Isso foi corroborado pela presença simultânea de mucinas tanto ácidas quanto neutras, além de proteínas totais e dissulfetos nas células da epiderme. Observou-se também a presença de mucopolissacarídeos e glicoconjugados nas células mucosas, assim como a existência de vastos depósitos de proteína distribuídos ao longo do tegumento.

3.2 *Potamotrygon motoro*

Com uma distribuição ampla entre as espécies desta família, *Potamotrygon motoro* é encontrada nas três maiores bacias hidrográficas da América do Sul: Amazonas, Paraná-Paraguai e Orinoco (ROSA, 1985; COMPAGNO e COOK, 1995; CARVALHO *et al.*, 2003). Sua disseminação geográfica extensiva, juntamente com as variações de coloração em sua pele, gerou várias questões taxonômicas sobre a identidade específica das populações de *P. motoro* nessas regiões. Além disso, foram identificadas espécies nominalmente sinônimas de *P. motoro* com base em amostras com colorações não usuais (CARVALHO *et al.*, 2003; LOBODA, 2006). *Potamotrygon motoro* foi originalmente descrita na bacia do Paraná-Paraguai, sendo o rio Cuiabá o local onde a espécime original foi coletada e descrita pela primeira vez. (MULLER E HENLE, 1841, apud LOBODA, 2010). Esta bacia foi o principal foco de estudo para a espécie, especialmente durante os anos 1960 pelo pesquisador Castex. A coloração dorsal do disco, característica morfológica distintiva é frequentemente usada para identificação, apresentando um padrão marrom ou cinza, com fileiras de ocelos tricolores distribuídos por toda a extensão do disco. Esses ocelos são compostos por uma pequena mancha central amarela, um anel intermediário laranja e um anel periférico negro (Rosa, 1985; Loboda, 2006). Assim como observado por CASTEX, (1963 apud LOBODA, 2010), a revisão taxonômica da espécie na bacia Paraná-Paraguai por Loboda (2006) não identificou variação significativa na coloração dorsal do disco.

Castex (1967 apud LOBODA, 2010) realizou diversos estudos sobre aspectos morfológicos de *P. motoro*, abordando temas como os denticulos dérmicos e as placas dérmicas. Seu estudo mais abrangente sobre *P. motoro* concluiu que a espécie não apresenta variação cromática significativa em sua coloração, pelo menos na bacia do Paraná-Paraguai (Castex, 1963 apud LOBODA, 2010). A diversidade alimentar dos peixes pode ser influenciada pela anatomia e hábitos alimentares de cada espécie, bem como pela disponibilidade e variedade dos recursos alimentares, os quais estão diretamente relacionados às condições do ambiente. Os principais componentes da dieta de *P. motoro*, como moluscos, insetos aquáticos e outros peixes, são considerados abundantes na região da planície de inundação do alto rio Paraná (AGOSTINHO *et al.*, 2001; TAKEDA e FUJITA, apud THOMAZ *et al.*, 2004). É importante ressaltar que o ecotipo e a morfologia caracterizados pela posição ventral da boca e pelo corpo achatado dorsoventralmente, indicam hábitos bentônicos. Essas características limitam a

diversidade da dieta, explicando a predominância de recursos alimentares também bentônicos. Além disso, as raias possuem um mecanismo de sucção oral que facilita a captura de organismos bentônicos, principalmente invertebrados (PANTANO-NETO, 2001).

3.3 Acidentes por peixes

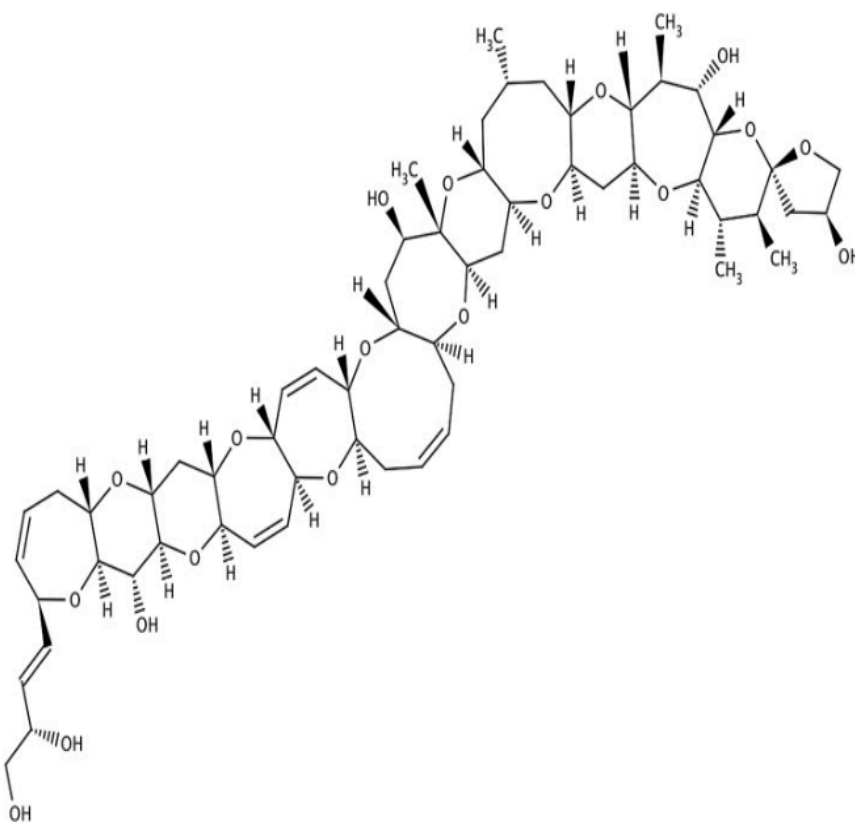
Ictismo é o nome dado aos acidentes ocasionados por peixes, podendo esses serem passivos ou ativos. Os acidentes passivos, também denominados envenenamentos, ocorrem por meio da ingestão das toxinas presentes nos tecidos dérmicos e são denominados de sarcotóxicos, que podem ser subdivididos em 3 tipos: ciguatóxico, escombrótico e tetrodontóxico (LIMA e FERREIRA, 2000; BUCARETCHI *et al.*, 2001).

O acidente ciguatóxico corresponde a ingestão da ciguatoxina (Figura 7), que é proveniente de fitoplâncton. Quando os peixes se alimentam desse fitoplâncton, conseqüentemente gera um acúmulo dessa toxina em seus dentes. Um exemplo muito comum relacionado a esse caso, seria a bicuda (*Sphyræna picudilla*), um peixe comestível que pode ser contaminado pela ciguatoxina presente na água e envenenar a pessoa (BUCARETCHI *et al.*, 2001). É muito importante salientar que os peixes destinados à alimentação, estão se tornando tóxicos de uma maneira gradativa, devido a alta contaminação das águas por meio da ciguatoxina. Somente na segunda metade do século XX, que essa toxina começou a se espalhar em muitas áreas geográficas, como resultado do crescimento exacerbado de pesca nos mares tropicais.

A citotoxina apresenta 13 anéis conjugados contendo oxigênio, incluindo dois espiroconjugado. Numerosos compostos naturais análogos (ciguatoxina-3C, gambiertoxina, gambierol, gimnocina A, entre outros) em conjunto a ciguatoxina em dinoflagelados e peixes contaminados, esses compostos naturais são extremamente tóxicos, ressaltando que mais de 500,00 habitantes das ilhas do Pacífico enfrentam envenenamentos desde o início da década de 1999 (HADDAD JR *et al.*, 2016). Isso acontece porque essa toxina se acumula em microrganismos marinhos, como moluscos, fazendo parte de toda cadeia alimentar. Outro exemplo são peixes que se alimentam de *Gambierdiscus toxicus*, que quanto maior a quantidade ingerida, mais ciguatoxina será acumulada nos tecidos. A ciguatoxina aumenta o influxo de Ca^{2+} seguido pela saída de Na^+ devido a interação com os canais iônicos não seletivos permeáveis ao Ca^{2+} (CaNSC), também proteases (calpaína-1 e calpaína-2) causando perturbação da

permeabilidade da membrana. Consequentemente, os sintomas de envenenamento são distúrbios gastrointestinais, nervosos e cardiovasculares, como náuseas, vômitos, dor de cabeça, tontura com agravamento dos casos em paralisia respiratória e morte. Existem relatos de dor intensa e queimação, sendo uma resposta específica após a ativação da ciguatoxina (HADDAD JR *et al.*,2016).

FIGURA 7: Estrutura da ciguatoxina.



Fonte: adaptado de HADDAD JR *et al.*, 2016.

O acidente escombrótico provém da contaminação de metil-mercúrio nos corpos d'água como mares, lagos, lagoas, rios etc. Devido a interferência humana, esse metil-mercúrio é absorvido e acumulado no metabolismo dos peixes ali presentes que consequentemente podem vir a ser pescados e posteriormente consumidos, ocasionando diversos sinais e sintomas (distúrbios sensoriais nas mãos e pés, alterando tanto a visão como a audição, fraqueza, paralisia ou morte) resultando no Mal de Minamata

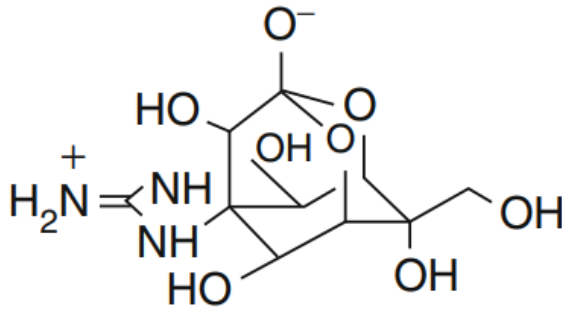
(HADDAD *et al.*, 2016). A doença recebeu esse nome devido a uma contaminação que ocorreu no Japão por volta dos anos 1970, na Baía de Minamata. Ocorreu o despejo de efluentes industriais, principalmente de mercúrio contaminando as águas e por consequência os peixes. Mais de 12500 pessoas foram diagnosticadas com essa doença entre 1953-1977, porém somente em 1972 que o caso ganhou repercussão e as vítimas foram indenizadas por toda essa tragédia (FRANCESCHI, 2011). Infelizmente mais locais foram atingidos com a contaminação de mercúrio sendo esses Niigata (1965), Iraque (1959), Paquistão (1961), Estados Unidos (1969) e o primeiro caso no Brasil ocorreu em São Paulo em 1966, devido a alta contaminação na agricultura por meio do uso de metoeximetilmercurio de agrotóxicos. (OPS, 1978 apud KITAHARA, 2000; AL-DAMLUJI, 1976; CONCON, 1988; JOHNSTON e SAVAGE, 1991; ALMEIDA *et al.*, 1976).

Também é possível envenenamento por meio da ingestão, sendo um exemplo bem conhecido o consumo do peixe baiacu da família Tetraodontidae, animais que possuem a tetrodotoxina (TTX), uma neurotoxina que é capaz de atuar no sistema neural, bloqueando os canais de sódio, ocasionando a paralisia (HADDAD JR, 2004; 2004). Vale ressaltar que quando se cozinha esse peixe não é possível inibir a ação da TTX, até porque além de ser estável em altas temperaturas, esta potencializa as propriedades da toxina (HADDAD JR., *et al.*, 2016). Alguns casos, tanto de envenenamento grave, quanto de óbito, já foram registrados pelo Centro de Informações Antiveneno da Bahia (HADDAD JR, 2003).

Tetrodotoxina, conhecida também como TTX é a principal neurotoxina hidrofílica (C₁₁H₁₇N₃O₈) presente em baiacus, sendo encontrada nas gônadas, fígado e baço, além da pele do peixe (Figura 8) (HADDAD JR, *et al.* 2016). O baiacu não apresenta capacidade de produzir essa toxina, mas ele consegue armazená-la em seus órgãos em prol de sua defesa. Para que isso seja possível, os peixes se alimentam de microorganismos que apresentam essa toxina e a quantidade de TTX encontrada, vai depender da época do ano, que no caso das fêmeas esse nível é aumentado no período da época reprodutiva. A TTX é termo-estável, ou seja, ela não perde suas propriedades caso ocorra congelamento, lavagem e até mesmo o cozimento. Essa toxina tem ação sobre os canais de sódio voltagem-dependentes, inibindo a despolarização e a propagação do potencial de ação pelas células nervosas. Em virtude disso, é possível observar nas vítimas fraqueza muscular, mialgias, ataxia, dentre outros sintomas. Conforme ocorre o agravamento das manifestações neurológicas, a pessoa pode

apresentar convulsões e parada cardiorrespiratória, náuseas, vômitos e diarreias. A vítima afetada vem a óbito devido às paralisias e falência respiratória (HADDAD, 2003, HADDAD *et al.*, 2016).

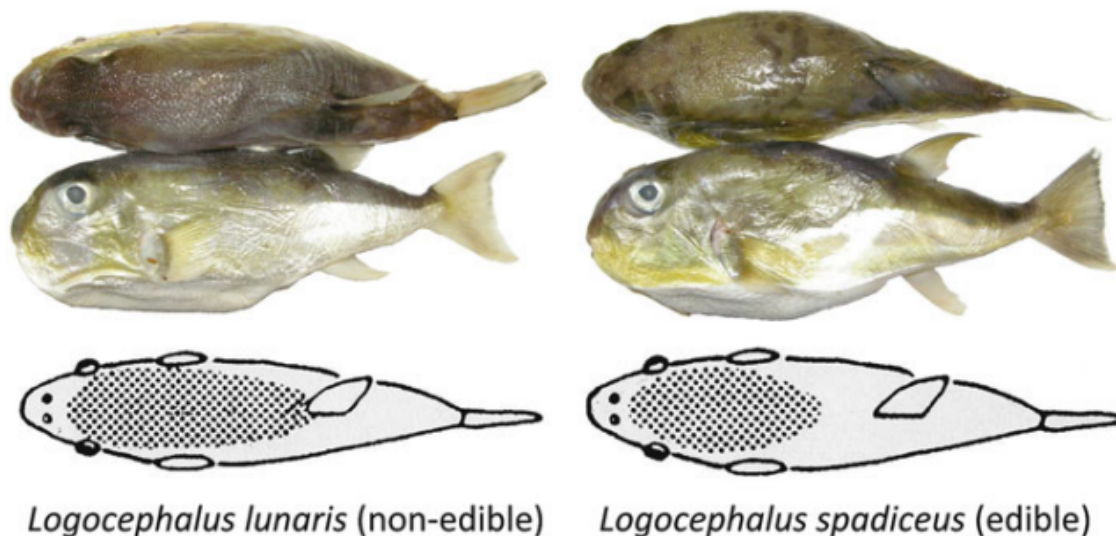
FIGURA 8: Estrutura da tetrodotoxina.



Fonte: adaptado de HADDAD JR. *et al.*, 2016.

As estatísticas do Ministério da Saúde, Trabalho e Bem-Estar do Japão, contabilizaram 301 acidentes de envenenamento por baiacu, sendo 434 pacientes e 19 mortes entre 2001 e 2010 (HADDAD JR. *et al.*, 2016). Arakawa e colaboradores, 2010 relataram um caso em 2008, onde um homem de 69 anos faleceu devido ao envenenamento por “usubahagi”. A vítima informou que comeu a carne crua e após 30 minutos os sintomas começaram. Primeiro todos os membros ficaram dormentes e meia hora depois ele vomitou e entrou em coma antes de chegar ao hospital. Sua morte ocorreu após 4 horas de envenenamento. Concluiu-se que o homem, acabou se confundindo e cozinhou baiacu (tóxico) com o “usubahagi” (não tóxico), causando o envenenamento. A figura 9 representa um indicativo de possíveis confusões a respeito da diferenciação de espécies comestíveis e não comestíveis.

FIGURA 9: As duas espécies são extremamente semelhantes, a única diferença é a distribuição dos espinhos dorsais. A esquerda a foto representa a espécime *Logocephalus lunaris* (não comestível) e a direita representa *Logocephalus spadiceus* (comestível).



Fonte: adaptado de HADDAD JR. *et al.*, 2016.

Os acidentes ativos ocorrem por meio dos ferrões ou mordidas e são conhecidos como acantotóxicos (LIMA e FERREIRA, 2000; BUCARETCHI *et al.*, 2001). O peixe introduz o ferrão no indivíduo, o qual geralmente é serrilhado, sendo envolto pela bainha do tegumento, onde estão localizadas as glândulas produtoras de peçonha, que inclusive podem estar relacionadas com os raios ossificados das nadadeiras (dorsal, caudal, peitoral, base do ferrão), sendo exemplos arraias *Dasyatis guttatus* e *Potamotrygon* sp. (HADDAD JR., 2000), bagre, peixe-escorpião (FIGUEIREDO e MENEZES, 1978) e peixe-sapo (BUCARETCHI *et al.*, 2001; FACÓ *et al.*, 2005). É sabido que os peixes peçonhentos apresentam células ou glândulas especializadas produtoras de peçonha que estão intimamente ligadas com seus aparatos inoculadores como espinho ou ferrão (SOLIANI, 2008).

Dentre esses peixes, algumas espécies são conhecidas como bagre (*Pimelodus spp.*). A maior diversidade de bagres ocorre em regiões tropicais, especialmente América do Sul, África sub-Saara e Sudeste da Ásia (MALABARBA, 1998). Esse peixe é conhecido como peixe de couro, pois não apresenta escamas. Seu corpo é achatado e a maioria apresenta hábitos bentônicos e sua coloração varia do cinza ao amarelo. Seus ferrões serrilhados são longos e robustos e estão localizados nas nadadeiras. Dois deles estão na região distal das nadadeiras peitorais e o terceiro está localizado na nadadeira dorsal. É importante ressaltar que os bagres também secretam a peçonha por poros glandulares axilares além da presença do muco, que é uma secreção proteica gelatinosa secretada por “células-club” (THULESIUS *et al.*, 1983; CHURCH e HODSON, 2002

apud SOLIANI, 2008). Essas células produzem e secretam muco, que atua como uma barreira protetora contra patógenos, toxinas e lesões mecânicas. O muco também facilita a movimentação de alimentos através do trato gastrointestinal e ajuda na troca gasosa nas brânquias dos peixes. Embora o termo "células-club" seja comumente usado para descrever esse tipo de célula em mamíferos, em peixes, elas são frequentemente referidas como células caliciformes devido à sua aparência e função semelhantes (SARASQUETE *et al.*, 2000).

Cathorops spixii, identificado por SCHMIDT, (2004), mais conhecido como bagre amarelo, destaca-se pela sua abundância nas regiões sudeste e sul do litoral do Estado de São Paulo, sendo responsável por um número significativo de acidentes na região. Tais incidentes ocorrem com maior frequência quando pescadores estão manuseando redes de pesca ou quando banhistas, de forma inadvertida, pisam em um indivíduo da espécie morto na praia. A manifestação clínica desses acidentes, conforme descrito por HADDAD JR, (2000) inclui sintomas severos como dores agudas e persistentes, câimbras musculares na região afetada, paralisia local, edema, gangrena, sudorese, mal-estar geral, febre, náuseas e vômitos, evidenciando a necessidade de cuidado e prevenção ao lidar com esta espécie ou frequentar suas áreas de ocorrência. MONDIN (2007), constatou que a peçonha do bagre amarelo é capaz de induzir atividade nociceptiva, edema, e inflamação.

Os peixes-escorpião, ocorrem ao longo da costa, sendo encontrados entre rochas e recifes de corais. Seu corpo é robusto e sua cabeça é larga, presença de duas barbatanas dorsais e pele sem escamas. Apresentam 18 espinhos peçonhentos espalhados por seu corpo, sendo esses distribuídos na região dorsal (13), pélvica (2) e anal (3). Esses espinhos apresentam glândulas produtoras de peçonha. De uma maneira geral, a peçonha desse peixe desencadeia dor intensa, necrose, edema, dificuldade respiratória, podendo agravar em paralisia e convulsão (HADDAD jr *et al.*, 2003). Em seu trabalho com a peçonha de *S. plumieri*, FIOROTTI, (2020), conseguiu isolar duas frações com propriedades de aglutinação de hemácias, nomeadas FH1 e FH3. As frações purificadas mostraram um efeito bacteriostático efetivo contra *S. aureus*. Uma análise preliminar indicou que ambas as frações possuem atividade citotóxica contra as linhagens celulares tumorais e normais.

O niquim é um peixe, que é encontrado no Brasil, principalmente ao longo da costa norte e nordeste no encontro das águas marinhas e fluviais. Apresenta 4 espinhos, sendo estes localizados nas nadadeiras dorsais (2) e acima das barbatanas peitorais (2).

Os espinhos são pontiagudos e canaliculados sendo revestidos por uma bainha do tegumento. Eles são ligados diretamente com as glândulas produtoras de peçonha (FRÓES, 1933 a, b, c apud ISHIZUKA, 2010). O acidente ocorre pelo contato e acontece quando a pele é perfurada pelo peixe, liberando a peçonha ao pressionar o tecido glandular. Esses acidentes são mais comuns nas áreas das mãos e pés, frequentemente quando as pessoas pisam no peixe sem perceber, durante a coleta de mariscos, ou ao manusear redes de pesca. As vítimas relatam uma dor aguda que se espalha até a base do membro afetado, seguida por uma reação inflamatória aguda e, posteriormente, necrose que pode ser difícil de cicatrizar. Sem tratamento apropriado, infecções bacterianas prolongadas são comuns e, em casos severos, pode ser necessária a amputação do membro (FACÓ, 2003).

Os efeitos induzidos pela administração subcutânea da peçonha do niquim em camundongos foram meticulosamente avaliados, abrangendo tanto manifestações locais quanto sistêmicas. Observou-se que os roedores submetidos a essa intervenção desenvolveram edema significativo e apresentaram uma variedade de sintomas neurológicos. Entre estes, destacaram-se movimentos rotatórios compulsivos, ereção pilórica, episódios convulsivos e, em situações mais graves, a morte. Os pesquisadores sugeriram que as graves alterações neurológicas e a letalidade observadas nos camundongos podem não ser replicadas em humanos devido à diferença na quantidade de peçonha injetada em relação ao peso corporal da vítima. Isso implica que, embora a peçonha do niquim seja potencialmente perigosa, os efeitos em humanos podem ser menos severos. (LOPES-FERREIRA *et al.*, 1998 apud FACÓ, 2000).

No caso das arraias, o envenenamento pode ocorrer por três comportamentos reflexos defensivos, dos quais as arraias podem se beneficiar, quando há alguma ameaça. Caso a arraia tenha um estímulo pontual que consiste em um local mais anterior, ela simplesmente consegue envergar seu dorso, fazendo com que haja a penetração vertical do ferrão. Agora, caso o terço posterior do disco for estimulado, as arraias irão deslocar vagarosamente seu ferrão até o estímulo e por fim, caso o estímulo aconteça de forma difusa, a arraia forma uma combinação com os dois tipos de reflexos e o replica (HALSTEAD, 1965).

A epidemiologia dos acidentes envolvendo arraias dulcícolas apresenta uma característica interessante em relação à sazonalidade. Em rios sujeitos a períodos de enchente e estiagem, os acidentes tendem a ocorrer principalmente durante o último, quando há uma grande afluência de pessoas aos balneários fluviais para atividades de

banho e pesca. Nesses rios, os acidentes com arraias são mais comuns entre os meses de maio e outubro. No entanto, em áreas próximas a represas de usinas hidrelétricas, onde são criadas praias e ilhas artificiais para a prática de pesca, natação e esportes aquáticos, de todos os acidentes com arraias tendem a ser mais uniformemente distribuídos ao longo do ano (HADDAD JR *et al.*, 2004).

A notificação de acidentes, na região norte, causados por arraias é menor do que seu registro, devido à geografia dos municípios. O acesso aos serviços de saúde pública é custoso, levando a uma preferência por tratamentos caseiros em detrimento da busca por assistência médica. Essa situação contribui para a subnotificação e a prevalência silenciosa desses acidentes (LAMEIRAS, 2013). Como os acidentes com animais aquáticos peçonhentos foram se tornando compulsórios, para que fosse possível padronizar as ocorrências, o Ministério de Saúde Brasileiro adotou um Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Nesse sistema está listado todos os envenenamentos e acidentes por animais peçonhentos e sua versão SINAN-NET foi implementada em 2007. A tabela 1 apresenta a relação dos acidentes por animais aquáticos registrados no SINAN (RECKZIEGEL *et al.*, 2015). As arraias são responsáveis pela maioria dos acidentes durante o período analisado, com um total de 2.842 casos, correspondendo a 69,0% de todos os registros. Além disso, houve um aumento geral na frequência dos acidentes com arraias ao longo dos anos, passando de 193 em 2007 para 473 em 2013. Águas-vivas e caravelas são o segundo grupo mais frequente em acidentes, com 540 casos reportados, o que representa 13,1% do total no período. A frequência desses acidentes mostra flutuações ano a ano, com um pico de 224 casos em 2008. Os peixes-sapos foram responsáveis por 4,4% dos acidentes, totalizando 181 registros entre 2007 e 2013. Os casos apresentaram variação ao longo dos anos, com um aumento notável de 18 casos em 2007 para 36 casos em 2013. Os acidentes causados por "Outros" animais aquáticos mostram uma tendência decrescente, iniciando com 113 casos em 2007 e caindo para 48 em 2013, somando um total de 467 registros no período, que correspondem a 11,3% do total.

TABELA 1: Acidentes por animais aquáticos registrados no SINAN, Brasil, 2007-2013.

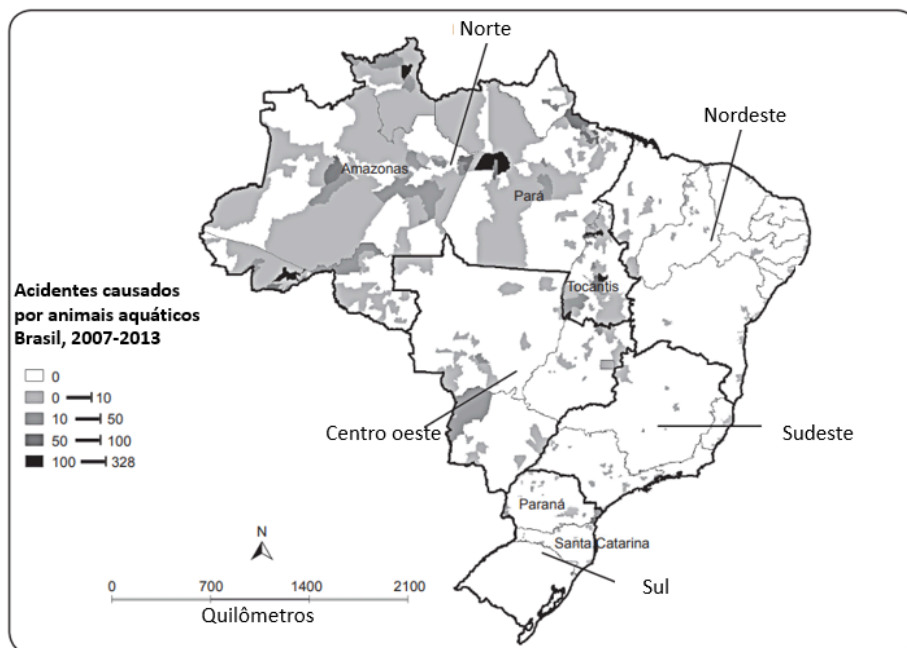
Tabela 1: Acidentes por animais aquáticos registrados no SINAN. Brasil, 2007-2013.

Animais Aquáticos	2007		2008		2009		2010		2011		2012		2013		2007-2013	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Arraias	193	42,9	331	58,5	387	67,5	405	76,6	429	77,7	624	82,5	473	68,4	2842	69,0
Águas-vivas/Caravela	114	25,3	127	22,4	75	13,1	26	4,9	43	7,8	47	6,2	108	15,6	540	13,1
Peixes-sapo	18	4,0	14	2,5	26	4,5	33	6,2	29	5,3	25	3,3	36	5,2	181	4,4
Bagres	9	2,0	6	1,1	6	1,0	9	1,7	4	0,7	14	1,9	23	3,3	71	1,7
Ouriços-do-mar	3	0,7	2	0,4	3	0,5	2	0,4	2	0,4	1	0,1	4	0,6	17	0,4
Outros	113	25,1	86	15,2	76	13,3	54	10,2	45	8,2	45	6,0	48	6,9	467	11,3
Brasil	450		566		573		529		552		756		692		4118	

Fonte: adaptado de Reckziegel *et al.*, 2015.

Em 2016, foi criado o Sistema de Notificação específico para Acidentes por Arraias (SNAA) destinado a documentar os incidentes ocorridos no Estado do Amazonas. O objetivo dessa iniciativa é fornecer dados que auxiliem os órgãos responsáveis na elaboração de estratégias de controle e prevenção desses acidentes (GUALBERTO *et al.*, 2016). O funcionamento do SINAN, sendo o sistema oficial para a notificação de acidentes por animais peçonhentos, foi apontado como algo que necessita de revisão e melhoria. Medidas eficazes para a prevenção desses acidentes dependem de uma base de dados confiável e da capacidade de relatar com precisão as condições reais. Estes problemas têm consequências socioeconômicas e epidemiológicas significativas. Sendo assim é necessário um conjunto de informações e sistemas, de modo a sanar todas as incertezas e incógnitas a respeito dos tratamentos ideais (GARRONE NETO *et al.*, 2005; RECKZIEGEL *et al.*, 2015). A figura 10 demonstra os estados Brasileiros e a relação dos acidentes reportados. Com relação as arraias o estado do Tocantins registrou o maior número de acidentes, sendo 796, seguido do Pará, que reportou 775 acidentes e o Amazonas com 412 acidentes.

FIGURA 10: Relação dos acidentes causados por animais aquáticos entre os estados Brasileiros (2007-2013).



Adaptado de Reckziegel *et al.*, 2015

No estado do Tocantins, foram registradas 25 lesões causadas por arraias de água doce, concentradas principalmente nas proximidades dos rios Tocantins, Araguaia e seus afluentes, com 19 casos oriundos do Rio Araguaia e seis do Rio Tocantins. Notavelmente, os acidentes ocorreram principalmente durante as tardes dos meses de julho e agosto, períodos característicos pela redução do nível da água. Um fato notório é que muitos dos acidentes envolveram não residentes locais, mas sim turistas atraídos pelas praias formadas pelos bancos de areia ao longo dos rios durante esta época do ano, muitas vezes sem conhecimento do risco representado pelas arraias, que também preferem estas áreas. A espécie mais envolvida nos acidentes foi a *Potamotrygon orbignyi* (HADDAD JR *et al.*, 2004).

Nos rios Paraguai e Paraná, foram registrados que 59 pessoas sofreram ferimentos causados por arraias, especificamente as espécies *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon falkneri*, sendo esta última a mais comum na região. A maior parte dos acidentes (cerca de 90%) envolveu homens, ocorrendo no inverno brasileiro, que corresponde ao período de seca, e durante o dia (aproximadamente 85% dos casos). A maioria dos ferimentos aconteceu quando as vítimas estavam em águas rasas sobre bancos de areia nas áreas portuárias de Corumbá (MS), bem como nas proximidades das

idades de Presidente Epitácio (SP), Três Lagoas (MS) e Foz do Iguaçu (PR), totalizando 51 casos (HADDAD JR *et al.*, 2004).

Atualmente não existem terapias diretas ao tratamento de edema, dor e necrose derivadas de acidentes com peixes peçonhentos, mas FERREIRA e colaboradores, 2023, desenvolveram um soro como tratamento contra esses acidentes. O soro foi produzido a partir de espécies de peixes como: *Thalassophryne nattereri*, *Scorpaena plumieri*, *Potamotrygon orbignyi* e *Cathorops spixii*, a fim de neutralizar as lesões tóxicas agudas. O soro composto por anticorpos IgG policlonais, demonstrou eficácia contra as diversas toxinas testadas, bloqueando as respostas complexas induzidas pelas peçonhas. A Figura 11 abrange os principais tratamentos em caso de envenenamento por peixes.

FIGURA 11: Primeiros socorros, como reconhecer e tratar acidentes com peixes peçonhentos.

PRIMEIROS SOCORROS
Como reconhecer e tratar acidentes com peixes



SINAIS NO CORPO	CAUSADORES	CUIDADOS MÉDICOS
Pedaços de ferrão visíveis, dor intensa	Bagres marinhos, mandis, arraias	Colocar na área atingida água quente (cerca de 50 °C) por 30 a 90 minutos, para reduzir a dor
Perfurações, raros espinhos, dor intensa	Peixe-escorpião (mangangá), niquim (peixe-sapo)	Retirar espículas ou fragmentos de ferrão ou epitélio glandular e aplicar anestésico local
Ferimentos com bordas azuladas ou pálidas, pedaços de ferrão, perfurações, dor intensa	Arraias e bagres marinhos e fluviais	Fazer exame radiológico se os sintomas persistirem Aplicar vacina contra tétano
Cortes profundos, dor moderada	Cações, barracudas, moreias, piranhas, peixes-cachorro, traíras	Fazer uma lavagem intensiva e uma exploração cirúrgica (procura por fragmentos de ferrões) da área atingida Antibióticos Aplicar vacina contra tétano

Fonte: adaptado de AFFONSO, 2023.

3.4 Peçonha de animais aquáticos

A peçonha é uma mistura complexa, formada por moléculas orgânicas e inorgânicas, que são ativas biologicamente, além de ser uma fonte de inúmeras substâncias com atividades farmacológicas. A peçonha auxilia o animal na captura e digestão do alimento, além de contribuir na defesa. É importante ressaltar que animais

da mesma espécie apresentam alterações na composição da peçonha, uma vez que existem diversos fatores que influenciam a composição da mesma, como o sexo, a idade, habitat, dieta, distribuição geográfica (MONTEIRO-DOS-SANTOS *et al.*, 2012; 2019).

A peçonha dos bagres apresenta fosfatases, esterases, fatores hemolíticos e vasoconstritores (THULESIUS *et al.*, 1983). A peçonha da espécie *Cathorops spixii* apresentam atividades nociceptivas, edematogênicas e proteolíticas, aumento da permeabilidade vascular induzida, alterações na microcirculação e hipercontração miofibrilar (MONDIN, 2003; JUNQUEIRA *et al.*, 2007).

A peçonha de *Scorpaena plumeri* (peixe-escorpião-preto) apresenta atividades hemorrágica e proteolítica, além de ser capaz de desencadear a perda da coordenação motora, hipersalivação além da arritmia cardíaca e respiratória (CARRIJO *et al.*, 2005). Sua peçonha é composta por toxinas como Sp-CTx. A peçonha da espécie *Thalassophryne nattereri* é capaz de induzir dor, edema, eritema e bolhas que evoluem para necrose (LOPES-FERREIRA, 2000). A peçonha é capaz de alterar a fisiologia renal dos ratos, além de mionecrose precoce, trombos e vasoconstrição (LOPES-FERREIRA *et al.*, 2001). A peçonha é composta por toxinas naterrinas e natectina que desencadeiam atividades de hipersensibilidade (MAGALHAES *et al.*, 2005; 2006; LOPES-FERREIRA *et al.*, 2004).

BORGES e colaboradores (2018), verificaram que a peçonha do peixe-escorpião apresenta diversas toxinas, incluindo lectinas, proteases, inibidores de proteases, uma toxina formadora de poros e hialuronidase. Estas toxinas contribuem para diversas atividades biológicas, como atividades proteolíticas, antimicrobianas, cardiovasculares, inflamatórias, hemolíticas e nociceptivas. Este estudo proteômico detalhado revelou a presença de 885 proteínas, com 722 exclusivas ao aparato inoculador e 391 ao muco, o que evidencia uma grande diversidade proteica. Embora várias das proteínas identificadas não tenham ligação direta com as atividades biológicas citadas, um subconjunto foi reconhecido como toxinas ou como moléculas de interesse, incluindo lectinas e inibidores de protease. Tais atividades foram observadas em ambos os extratos, porém, os efeitos tóxicos mais significativos foram atribuídos somente ao extrato do aparato inoculador.

MALACARNE e colaboradores (2018) destacaram que as proteínas responsáveis pela atividade hemolítica presentes na peçonha de peixes escorpião (*Scorpaena plumeri*) são cruciais para a maioria dos efeitos observados no

envenenamento, incluindo efeitos neurotóxicos, cardiotoxicos e inflamatórios. A Sp-CTX, um componente bioativo majoritário da peçonha, é identificado como uma glicoproteína dimérica de alta massa molecular, com habilidade de formar poros. A atividade hemolítica do Sp-CTX é dependente de cálcio e pode ser abolida por íons de zinco e EDTA. Além disso, a atividade hemolítica é influenciada pelo pH e certos lípidos de membrana, sugerindo uma interação direta na formação do poro pela toxina. Interessantemente, o estudo também relata pela primeira vez que o Sp-CTX é parcialmente responsável pela dor e inflamação observadas no envenenamento.

Em um estudo, os autores investigaram a atividade hemaglutinante da peçonha de *Scorpaena plumeri*, que parece estar associada à presença de lectinas do tipo C, embora esta atividade ainda não tenha sido caracterizada quimicamente ou funcionalmente. Foram obtidas frações purificadas com atividade aglutinante dependente de Ca^{2+} contra eritrócitos de coelho. Além disso, foi observado que as frações tinham propriedades bacteriostáticas contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e eram citotóxicas contra linhagens celulares tumorais e não tumorais. Também foi detectada uma tendência à formação de edema quando as frações foram injetadas em patas de camundongos (FIOROTTI *et al.*, 2022).

A pesquisa em torno dos componentes bioativos presentes no muco de espécies marinhas têm desvendado potenciais aplicações terapêuticas e revelado surpreendentes propriedades biológicas. Neste contexto, o trabalho de COELHO e colaboradores, (2019a) mostraram que o muco da arraia marinha *Hypanus americanus* apresenta ação pró inflamatória, causando edema devido a presença de peptídeos derivados de proteínas relacionadas ao sistema imunológico e também da presença de peptidases. Foi identificado que o muco apresenta peptídeos capazes de atuarem contra *C. albicans*. COELHO e colaboradores, (2020) também revelaram que o muco é capaz de induzir edema e iniciar o recrutamento de leucócitos em camundongos. Uma fração do muco foi capaz de potencializar a fagocitose em macrófagos e exibe atividade antimicrobiana contra *T. rubrum*, *C. neoformans*, e *C. albicans*. Também foram realizados alguns estudos proteômicos capazes de identificar proteínas relacionadas ao sistema imunológico, sendo essas actina, histonas, hemoglobina e proteínas ribossômicas.

A peçonha da arraia marinha *Dasyatis sephen* mostrou-se capaz de inibir a proliferação de células HeLa, sugerindo um mecanismo oxidativo subjacente a este efeito antiproliferativo. O estudo mostrou como a peçonha influencia a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), alterações no potencial da membrana mitocondrial

e morfológicas apoptóticas, ainda foi observado que a peçonha estimulava marcadores de peroxidação lipídica e aumentava os níveis de ROS intracelular, o que é um indicativo de estresse oxidativo (RAYESKUMAR *et al.*, 2015). KUMAR e colaboradores (2011) investigaram as atividades fibrinogenolítica e anticoagulante do tecido que cobre os ferrões das arraias marinhas *Dasyatis sephen* e *Aetobatis narinari*. Os resultados demonstram a presença de atividades fibrinogenolíticas, anticoagulante e gelatinolítica nos extratos da peçonha de ambas as espécies de arraias.

A quantidade e a variedade dos componentes bioativos que fazem parte da composição da peçonha de arraias de água doce, está associada com a intensidade dos efeitos clínicos nas vítimas de envenenamento. As arraias da espécie *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon motoro* apresentam em sua peçonha toxinas com atividades fosfolipásica e elastinolítica. Além disso, a peçonha da *Potamotrygon falkneri* desencadeia reações inflamatórias, nocicepções, edemas e dermonecrose (MAGALHÃES *et al.*, 2006; BARBARO *et al.*, 2007; HADDAD JR, 2008; MAGALHÃES, 2008; ANTONIAZZI, 2011, MAGALHÃES, 2017), enquanto a peçonha de *Potamotrygon motoro* pode induzir rabdomiólise sistêmica, atividade miotóxica e resposta inflamatória (DOMINGOS *et al.*, 2011; LAMEIRAS *et al.*, 2014). No trabalho de OLIVEIRA JR (2014) sobre a análise dos transcritos das glândulas de peçonha de arraias *P. motoro* e *P.falkneri*, foi possível constatar a presença de fosfolipase A1, fosfolipase A2 e fosfolipase D. Também foi encontrado nos transcritos das glândulas de peçonha de arraias *P. falkneri* e *P.amandae*, fosfolipases A2, metaloproteinasas, lectina tipo C, serinoproteases e L-aminoácido oxidases (OLIVEIRA JR, *et al.*, 2016). Tanto as peçonhas de *Potamotrygon scobina* como *Potamotrygon orbigny* apresentam atividades edematogênicas e nociceptivas, e indução de necrose (MAGALHÃES *et al.*, 2006). A peçonha de *Potamotrygon orbigny* apresenta em sua composição um peptídeo, denominado de Orpotrin, que induz vasoconstrição, e outro denominado de Porflan, capaz de interagir com os fosfolipídios presentes na membrana.

Uma hialuronidase, foi identificada e isolada por MAGALHÃES e colaboradores, (2008). Essa enzima está presente no epitélio do ferrão, e possui massa molecular de 79 kDa, temperatura ótima de 37°C, pH 4.2. De acordo com SILVA e colaboradores (2018), a hialuronidase é expressa nos transcritos de três arraias de água doce (*Potamotrygon amandae*, *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon falkneri*), sendo um dos componentes em maior abundância na peçonha.

As fosfolipases são hidrolases responsáveis pela clivagem das moléculas de fosfolipídios, hidrolisando uma ou mais ligações ésteres dos glicerofosfolipídeos. Existem fosfolipases do tipo A₁, A₂, C e D, sendo a fosfolipase A₂ mais comumente encontrada nas peçonhas, pois ela é capaz de desencadear atividades miotóxicas, neurotóxicas, inibição da agregação plaquetária, entre outras. As fosfolipases são divididas de acordo com a sua massa molecular, apresentando relatos na literatura de fosfolipases com baixa massa molecular de 13-15 kDa e alta massa molecular 140-400 (SIX e DENNIS, 2000; MUKHERJEE, 2014). De acordo com a literatura, as serinoproteases apresentam massa molecular entre 26-67 kDa, sendo as responsáveis pelo controle da coagulação sanguínea e inflamação. Quando essas se fazem presente na peçonha, acabam atuando para a ativação da cascata da coagulação, resultando em agregação plaquetária (MURAKAMI e ARNI, 2003).

As metaloproteinases são classificadas em três grupos, sendo P-I, P-II e P-III. Enfatizando-se a classe P-III, esta apresenta massa molecular entre 60-100 kDa, apresentando maior atividade hemorrágica, devido a presença de um domínio catalítico de metaloproteinases, um domínio de desintegrina na porção terminal C e um último domínio que é abundante em cisteína, responsável por atuar na adesão plaquetária (SAJEVIC *et al.*, 2011). É sabido que as enzimas L-aminoácidos oxidase apresentam massa molecular entre 110 e 150 kDa. Esta por sua vez, apresenta ação apoptótica, hemorrágica, antiviral, citotóxica, atividade antibiótica, entre outras (COSTA *et al.*, 2015).

A diversidade bioquímica do muco e da peçonha nas espécies aquáticas e seu impacto biológico têm sido temas de intenso estudo, especialmente em relação à peçonha de arraias, que possui uma complexa mistura de componentes com várias atividades biológicas. A maturidade desses animais desempenha um papel fundamental na composição e nos efeitos resultantes de sua peçonha. Nesse âmbito, MONTEIRO-DOS-SANTOS e colaboradores (2019) constataram que a resposta inflamatória induzida da peçonha está relacionada com a maturidade das arraias *Potamotrygon rex*. A atividade nociceptiva é induzida pela peçonha de arraias fêmeas filhotes, porém em ambos os sexos foi constatado que a peçonha induz a fase exsudativa do processo inflamatório. A peçonha entre indivíduos jovens difere na composição molecular, a peçonha das fêmeas apresenta moléculas de maior e menor massa molecular, enquanto a peçonha dos machos apresenta apenas moléculas de menor massa

molecular. Com relação a peçonha das arraias fêmeas jovens, predominam moléculas de menor massa molecular capazes de interagir com nociceptores cutâneos enquanto na peçonha de fêmeas adultas apresenta uma maior concentração de proteínas, o que explicaria o extravasamento de leucócitos.

Devido à complexidade e abrangência na composição bioquímica do muco e da peçonha das arraias, a evolução dos sintomas do acidente são demasiado preocupantes. Em primeiro momento a vítima apresenta dor local intensa seguido dos sintomas sistêmicos que podem ser: febre, náuseas, vômitos, sudorese, agitação, entre outros. O local lesionado pode apresentar parestesia, edema, eritema, hemorragia e evolução para necrose. Foi constatado que em alguns pacientes, ocorreu a formação de uma úlcera na lesão, demorando cerca de 3 meses para sua cicatrização total, além da formação de grandes cicatrizes durante esse processo. (HADDAD JR *et al.*, 2004). Alternativamente ou associado a esta prática, as populações ribeirinhas tratam as “ferroadas” de arraias com emplastos de algumas plantas, sendo a mais comum cipó-de-arraia (*Cissus spinosa*) (GODOY, 2019).

3.5 Muco de animais aquáticos

O muco que recobre a pele dos peixes desempenha um papel crítico em sua sobrevivência, oferecendo uma barreira protetora contra patógenos, parasitas e toxinas ambientais. Este revestimento viscoso é secretado por células especializadas localizadas na epiderme dos peixes, conhecidas como células mucosas ou células goblet (SHEPARD, 1994). A composição do muco é complexa e inclui uma mistura de glicoproteínas, enzimas, e imunoglobulinas que ajudam a pele do peixe a funcionar como um órgão imunológico ativo. As glicoproteínas, que são moléculas de proteína com cadeias de carboidratos anexadas, fornecem a textura viscosa do muco e ajudam a capturar detritos, patógenos e partículas químicas, impedindo que eles entrem em contato direto com a pele do peixe (SUBRAMANIAN *et al.*, 2007).

Adicionalmente, o muco contém várias enzimas antimicrobianas como a lisozima, que degrada as paredes celulares bacterianas, e antioxidantes que protegem os tecidos do peixe contra os danos causados pelos radicais livres (WHYTE, 2007). Estas propriedades fazem do muco uma primeira linha de defesa crucial contra infecções e estresse ambiental. Pesquisas também sugerem que o muco dos peixes pode ter funções adicionais, incluindo a facilitação da locomoção na água ao reduzir o atrito entre a pele do peixe e a água, e a participação em comunicações químicas dentro de espécies, onde

pode ser usado para sinalizar condições de saúde ou status reprodutivo (ZHANG *et al.*, 2015).

O muco dos bagres é composto principalmente por glicoproteínas, sendo encontrado também fosforilase, fosfatase ácida, esterases, fatores vasoativadores e aglutinantes do plasma, além de fator hemaglutinante (AL-HASSAN *et al.*, 1986; THOMSON *et al.*, 1989; 1990). Na espécie *Cathorops spixii*, o muco apresenta atividades nociceptiva, edematogênica e proteolítica, aumento da permeabilidade vascular induzida, alterações na microcirculação e hipercontração miofibrilar (MONDIN, 2003; JUNQUEIRA *et al.*, 2007).

No salmão (*Salmo salar*), o muco cutâneo é crucial para a proteção contra patógenos, especialmente em suas migrações de longa distância entre água doce e salgada. O muco contém enzimas como a lisozima, que lisa as paredes celulares bacterianas, ajudando a prevenir infecções durante suas jornadas exaustivas (SHEPHARD, 1994). Além disso, o muco é necessário para regular a osmorregulação, vital para a adaptação do salmão às mudanças de salinidade ao migrar entre os habitats marinho e fluvial (EASY & ROSS, 2009).

O peixe-zebra (*Danio rerio*) utiliza o muco principalmente como um mecanismo de defesa contra predadores e microrganismos. Um estudo mostrou que o muco de *Danio rerio* possui propriedades antibacterianas, devido às diversas proteínas antimicrobianas que ele contém (RAJANBABU e CHEIN, 2011). Estudos também sugerem que o muco do peixe-zebra pode desempenhar um papel no comportamento social e na comunicação química entre os membros da espécie (SUBRAMANIAN *et al.*, 2007; PLAUTZ e SALZBURGER, 2010; ZHANG *et al.*, 2015).

O muco do peixe-palhaço é conhecido por sua capacidade de prevenir a ferroada das anêmonas com as quais esses peixes formam uma relação simbiótica. As proteínas no muco do peixe-palhaço o protegem das toxinas da anêmona, permitindo que ele se abrigue entre os tentáculos peçonhentos sem ser ferido. Além disso, o muco pode desempenhar um papel na proteção contra os raios UV em habitats de recifes de coral expostos à luz solar intensa (ONG *et al.*, 2016).

O dorso das arraias é revestido por muco, que é produzido pelas células epidérmicas (GARRONE NETO *et al.*, 2005; GARRONE NETO *et al.*, 2007; HADDAD JR *et al.*, 2004). É importante destacar que o muco atua como a primeira linha de defesa das arraias contra agentes patogênicos (ZHAO *et al.*, 2008). O muco pode apresentar grande importância farmacológica, pois em alguns peixes, como a

arraia, esse muco apresenta uma atividade antimicrobiana contra diversos agentes infecciosos (MOZUMDER, 2005). De acordo com um estudo realizado por KLESIUS e colaboradores (2008), foi possível identificar a presença de substâncias como aminoácidos, carboidratos, peptídeos e glicopeptídeos no muco de arraia marinha. Autores como WEISS e WOLFENDEN (2001) constataram a presença de 5'-nucleotidase e fosfodiesterase, além de ALEXANDER (1992) que verificou componentes como imunoglobulinas, lectinas, e enzimas proteolíticas. Mesmo sendo secretado por uma diversidade de espécies de peixes, o muco é pouco estudado, provavelmente por ser extremamente sensível ao pH, calor, armazenamento, liofilização entre outras (BAUMANN *et al.*, 2014). Em 2020, um estudo constatou que a espécie *P. aiereba* apresenta muco imunogênico, isto foi mostrada uma reação antigênica cruzada, além de que o muco foi capaz de estimular uma resposta imune, celular e humoral (THOMAZI, *et al.*, 2020). TURÍBIO, (2018) constatou que o muco e a peçonha da arraia *Paratrygon aiereba*, desencadeou atividade nociceptiva e aumento no rolamento de leucócitos .

Quanto ao muco de *P. motoro*, DOMINGOS e colaboradores, (2011) constataram a presença de bactérias gram-negativas, que apresentam uma capacidade de lisar os eritrócitos humanos, além de apresentar resistência contra pelo menos um antibiótico, desencadeando em uma possível infecção secundária. Algumas dessas bactérias apresentam a capacidade de sobreviver no tecido necrosado, dificultando ainda mais o tratamento da lesão.

Apesar de sua importância, a produção excessiva de muco ou alterações em sua composição podem ser indicativos de estresse ou doença nos peixes, tornando-o um parâmetro vital no monitoramento da saúde dos peixes em ambientes naturais e em aquicultura (EASY e ROSS, 2009). A compreensão aprofundada do papel e da composição do muco cutâneo dos peixes não só é essencial para a biologia dos peixes, mas também tem implicações práticas na gestão da saúde dos peixes, com potencial para melhorar as práticas de manejo.

3.6 Peptídeos antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) provenientes de peixes são fundamentais na defesa contra agentes patogênicos como fungos, bactérias, vírus e parasitas, integrando o sistema imunológico inato destes organismos. Eles operam essencialmente na membrana celular dos patógenos, diminuindo assim a chance de eles desenvolverem

resistência e oferecendo uma alternativa aos antibióticos tradicionais. É possível que os peptídeos antimicrobianos (PAMs) de ocorrência natural, apresentam certas propriedades que limitam seu uso em tratamentos médicos, tais como uma tendência à instabilidade em razão da degradação pelas proteases presentes no organismo hospedeiro. Outras limitações incluem uma seletividade insuficiente, solubilidade em água reduzida, potencial de causar a lise de células sanguíneas (hemólise), toxicidade para o organismo que os recebe e uma sensibilidade aumentada à presença de íons de sal. Para contornar esses obstáculos, uma opção seria os peptídeos antimicrobianos sintéticos. Essas substâncias são criadas através de um processo de síntese cuidadosamente planejado, que leva em conta a relação entre a estrutura e a função do peptídeo. Ao construir o peptídeo aminoácido por aminoácido, é possível realizar ajustes precisos, permitindo a análise e aperfeiçoamento dessas moléculas. Pesquisas destacam a eficácia desses peptídeos contra patógenos, evidenciando sua capacidade de impedir a germinação e o crescimento de fungos notórios. A interação dos peptídeos com células fúngicas resulta em danos estruturais, como distorções na parede celular e extravasamento de conteúdos internos, além da criação de poros nas membranas, destacando sua viabilidade como base para o desenvolvimento de novos tratamentos antifúngicos (LIMA, 2021).

O muco que recobre a pele dos peixes é uma fonte inexplorada de recursos biológicos. O muco da espécie *Scorpaena plumieri*, por exemplo, apresenta atividade antimicrobiana contra *Streptococcus aureus* e *Escherichia coli*. (BORGES *et al.*, 2018). No estudo de NURHIKMAH e colaboradores (2022) sobre garoupas híbridas (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus lanceolatus*) e sua resistência ao *Vibrio alginolyticus*, foi utilizada uma abordagem proteômica para explorar mudanças no conteúdo protéico do muco em resposta à infecção. Proteínas relacionadas ao sistema imunológico, como Cistatina B e Componente do Complemento C6, foram encontradas em abundância nos indivíduos resistentes, proporcionando indicações sobre biomarcadores potenciais para resistência a doenças. No trabalho de HUANG e colaboradores (2021), estudaram sobre a análise proteômica do muco da pele de duas espécies de peixes antárticos, o *Chionodraco hamatus* e o *Notothenia coriiceps*. Este estudo revelou um perfil proteico específico associado à resposta imune, sugerindo um papel crucial de proteínas como C3 e C9 no sistema imunológico desses peixes frente a condições extremas da Antártida. Por fim, no artigo de revisão de REVERTER e colaboradores (2018) enfatizam as funções biológicas e ecológicas do muco externo de

peixes, salientando sua importância na proteção contra patógenos, além de seu papel em interações intra e interespecíficas. Esta revisão enfatiza o avanço das ciências "ômicas" na pesquisa do muco e sua importância no estudo da composição e função do muco de peixes.

Diversas outras espécies de peixes expressam peptídeos antimicrobianos (Quadro 1). Alguns estudos indicam que o extrato do muco pode ser também uma importante fonte de lipídios, sendo identificado compostos em alguns peixes (tainha e peixe-porco de cor cinzenta): ácidos graxos monoinsaturados (MUFA), exemplificados pelo ácido oleico, e os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), que incluem o linoleico, alfa-linolênico, o docosahexaenóico, o araquidônico e o eicosapentaenóico, além dos ácidos graxos saturados (SFA), como os ácidos palmítico e esteárico. Acredita-se que os lipídios estejam envolvidos na manutenção da estrutura interna do muco através de interações com glicoproteínas (DÍAZ-PUERTAS, 2023).

Em estudos distintos sobre diversas moléculas, EKMAN e colaboradores (2015), delinearam o perfil metabólico do muco cutâneo do peixe *Pimephales promelas* visando estabelecer um método para o monitoramento e controle ambiental. Identificaram-se metabólitos que possuem efeitos antibacterianos. Como exemplo, verificou-se que o ácido azelaico impede o crescimento de bactérias, e o ácido hidroxio-capróico provou ser efetivo no combate a bactérias e fungos. Já em uma pesquisa realizada por PATEL e colaboradores (2020), observou-se que o muco do barbo-comum (*Puntius sophore*) contém metabólitos com propriedades antimicrobianas. Dentre esses, destacam-se os amino açúcares como glucosamina e ácido neuramínico, a cisteamina, que é um dissulfeto orgânico, além da dihidrofungosina, um tipo de amino álcool, e a fitoesfungosina, pertencente ao grupo dos esfingolípido.

QUADRO 1: Espécies de peixes e seus respectivos peptídeos antimicrobianos.

Espécie de peixe	Peptídeos Antimicrobianos	Referência
<i>Oncorgynchus mykiss</i>	Histona 2A Parasin I Oncorrincina II Oncorrincina III	FERNANDES <i>et al.</i> , 2002 FERNANDES <i>et al.</i> , 2003 FERNANDES <i>et al.</i> , 2004
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Hioscina Histona 2A Parasin I	BIRKEMO <i>et al.</i> , 2003
<i>Parasilurus asotus</i>	Parasin I	PARK <i>et al.</i> , 1998

	Histona 2A Hioscina	CHO <i>et al.</i> , 2002
<i>Gadus morhua</i>	Histona H2B Piscidina 1, 2 e 2	BERGSSON <i>et al.</i> , 2005 RUANGSRI <i>et al.</i> , 2012
<i>Salmo salar</i>	Oncorrincina II	LUDERS <i>et al.</i> , 2005
<i>Myxine glutinosa</i>	Moxonidina	SUBRAMANIAN <i>et al.</i> , 2009
<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	Pelteobagrín	SU, 2011
<i>Pardachirus marmoratus</i>	Pardaxina I e II	LAZAROVICI <i>et al.</i> , 1986
<i>Pleuronectes americanus</i>	Pleurocidina	COLE <i>et al.</i> , 1997

Fonte: adaptado de DÍAZ-PUERTAS, 2023

O muco que recobre as arraias, tanto as marinhas quanto as de água doce, também apresentam atividades antimicrobianas (Quadro 2). Um peptídeo antimicrobiano denominado PcfHb, foi isolado do muco da arraia *Potamotrygon cf henlei* por CONCEIAÇÃO e colaboradores (2012). Este peptídeo, estruturalmente semelhante às cadeias β da hemoglobina, exibiu forte atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e fungos. Doses mínimas inibitórias foram capazes de suprimir o crescimento de *Micrococcus luteus* e *Candida tropicalis*, enquanto uma atividade antimicrobiana foi observada contra *Escherichia coli*. A proteína também exibiu atividade pró-inflamatória em camundongos Swiss machos, resultando em um aumento do rolamento de leucócitos. SANTOS e colaboradores, (2011) descrevem que tanto o muco quanto a peçonha da arraia *Potamotrygon rex* foram associados a processos inflamatórios, enquanto foi observada uma propriedade antimicrobiana específica no muco.

QUADRO 2: Relação de espécies de arraias e suas respectivas atividades contra microorganismos patogênicos.

Espécies de arraias	Atividade antimicrobiana	Atividade antifúngica	Referência
---------------------	--------------------------	-----------------------	------------

<i>Dasyatis sephen</i> <i>Himantura gerradi</i>	<i>Salmonella typhi</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Streptococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Vibrio cholerae</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>T. rubrum</i> <i>Alternaria alternaria</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium sp</i>	VENNILA <i>et al.</i> , 2011
<i>Dasyatis pastinaca</i> L.		<i>Candida albicans</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida tropicalis</i>	FUOCHI <i>et al.</i> , 2017
<i>Potamotrygon rex</i>	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Escherichia. coli</i>	<i>Candida albicans</i> <i>Candida tropicalis</i>	MONTEIRO-DOS-SANTOS <i>et al.</i> , 2011
<i>Hypanus americanus</i>		<i>Candida albicans</i> <i>T. rubrum</i> , <i>C. neoformans</i>	COELHO <i>et al.</i> , 2019a COELHO <i>et al.</i> , 2020

Como existem uma vasta quantidade de compostos não identificados na peçonha e no muco da arraia, se faz mais que necessário trabalhos para a caracterização e avaliação das atividades dos componentes desconhecidos. Além dos poucos já identificados, espera-se que outros compostos também apresentem propriedades biotecnológicas.

4-MATERIAL E MÉTODOS

4.1-Coleta dos animais

Os animais utilizados foram provenientes de doações do Bioparque Pantanal, localizado no município de Campo Grande/MS, nas seguintes coordenadas: 20°27'18.3"S 54°34'33.6"W. Ao total foram doadas 3 espécimes *Potamotrygon motoro* (figura 12). As arraias foram transportadas em caixas com gelo até o Laboratório de Bioquímica e Microorganismos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS-CG) e as amostras biológicas foram imediatamente coletadas.

FIGURA 12: Espécime da arraia *Potamotrygon motoro* doação do Bioparque Pantanal, Campo Grande/MS.



Fonte: AUTORA.

4.2-Obtenção e processamento do extrato proteico do ferrão

Os ferrões foram extraídos com o auxílio de um bisturi e foram armazenados em tubos do tipo Falcon (50mL), em temperatura -20°C no laboratório de Bioquímica Geral e Microorganismos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus Campo Grande. A maceração dos ferrões foi feita com o auxílio de um martelo, para que este resultasse em pequenos fragmentos que foram posteriormente pesados e diluídos em água destilada, em uma proporção de 1g:5mL. O preparo foi feito segundo

MAGALHÃES, 2017 com modificações. Todo o material foi centrifugado por 10 minutos a 15.000 g. O sobrenadante foi coletado, identificado, armazenado a -20°C até o uso e denominado extrato protéico do ferrão.

4.3-Obtenção e processamento do extrato proteico do muco

O muco foi extraído com o auxílio de uma espátula de silicone. Foi realizada a raspagem da porção dorsal do animal. Todo o muco coletado foi armazenado em tubos tipo Falcon (50 mL) devidamente identificados. O material foi centrifugado por 10 minutos a 15.000 g. Foram realizadas centrifugações subsequentes nas mesmas condições, resultando em 2 sobrenadantes, que posteriormente foram coletados, identificados como S1 e S2, que posteriormente foram agrupadas, armazenadas a -20°C até o uso e denominadas de extrato proteico do muco (adaptado de OLIVEIRA, 2013).

4.4-Dosagem de proteínas dos extratos protéicos

Para verificar a concentração total de proteínas do extrato proteico do ferrão e do muco foi utilizado o método de Bradford, usado como padrão a albumina bovina (BRADFORD, 1976). Uma amostra do extrato (50µL) foi diluída em 1mL de solução de Bradford. Depois de 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, a leitura da absorbância das amostras foi realizada no leitor de microplacas SPECTRAMAX 348 PLUS. A absorbância foi medida a 595nm.

4.5-Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

4.5.1 Preparo das amostras para eletroforese

Inicialmente foi feito um pool dos sobrenadantes 1 e 2 do extrato protéico do muco. As amostras do extrato do ferrão e do muco foram preparadas com a adição de SDS (1:1 (v/v), azul de bromofenol (1:5(v/v) de amostra) e β-mercaptoetanol (1:10 (v/v)), de amostra em um volume final de 30 µL por amostra.

4.5.2- Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese SDS-PAGE foi utilizada para obtenção do perfil proteico do extrato proteico do muco e do ferrão de *P. motoro*, utilizando o sistema BIORAD. Primeiramente, foi feita uma corrida com um gel de 12% em 90 Volts com duração de 3 horas e 30µL de amostras. Como os resultados não foram satisfatórios, optou-se pelo gel de 15% de separação e o de gel de empacotamento manteve-se 5% de acrilamida. O tampão de corrida utilizado foi o descrito por LAEMMLI, 1970 (Tris HCl 0,025 M; glicina 0,192M; SDS 1% e água destilada, pH 8,3). Para o preparo do gel de corrida, foi utilizado acrilamida/bis-acrilamida 30% (28g acrilamida; 0,735g bis-acrilamida), tampão Tris HCl 3,0M pH 8,9; água destilada; SDS 1%, tetrametiletenodiamina

(TEMED) e persulfato de amônia 10%. Para o preparo do gel de empacotamento foi utilizado acrilamida/bis-acrilamida 30% (28g acrilamida; 0,735g bis-acrilamida), tampão Tris HCl 1,5 M pH 8,9, água destilada, SDS 1%, tetrametiletenodiamina (TEMED) e persulfato de amônia 10%.

Posteriormente as amostras foram aplicadas no gel, a corrida foi realizada em 90 Volts por aproximadamente 2 horas e 30 minutos. O gel foi corado com azul de Coomassie (0,1g coomassie R-250, metanol e ácido acético). Com relação à descoloração do gel, foi utilizado uma solução descorante (ácido acético 10% e etanol 30%). Para estimativa das massas moleculares, utilizou-se um marcador de massa molecular Precision plus protein standards, 10-250 kDa (BIORAD®).

4.5.3-Eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas de baixa massa molecular: Método de SHÄGGER & JAGOW (1987)

A porcentagem do gel de corrida foi de 16,5%, o gel de empacotamento manteve-se o de 5%. Para o preparo do gel de corrida, foram utilizados acrilamida/bis-acrilamida 49,5%, tampão Tris HCl 2,0M pH 8,45, glicerol 100%, persulfato de amônio 20%, tetrametiletenodiamina (TEMED) e água destilada. Para o preparo do gel de empacotamento, foram utilizados, acrilamida/bis-acrilamida 49,5%; tampão Tris HCl 2,0M pH 8,45; persulfato de amônio 20%; tetrametiletenodiamina (TEMED) e água destilada

Dois tampões diferentes foram utilizados para a corrida do gel. O tampão do eletrodo catodo (Tris 0,1M; tricina 0,1M; SDS 0,1%, pH 8,25) e o tampão do eletrodo anodo, (Tris 0,2M, pH 8,9).

Posteriormente as amostras foram aplicadas no gel. Foi realizada uma corrida em uma voltagem de 85V com duração de 2 horas e 50 minutos, após a corrida que posteriormente foi dividido ao meio. A primeira metade do gel foi corada com azul de Coomassie (0,1g coomassie R-250, metanol e ácido acético), para que fosse possível a visualização das bandas presentes no gel. A seguir, foi utilizado uma solução descorante (ácido acético 10% e etanol 30%). A segunda metade do gel foi corada com o uso do Kit de corante de prata ProteoSilver (SIGMA-ALDRICH®). Para estimativa das massas moleculares, utilizou-se um marcador de massa molecular Precision plus protein standards, 10-250kDa (BIORAD®). Os géis foram fotografados com o auxílio da câmera de celular ou foram escaneados com o auxílio do programa (Scan Epson) da impressora (Epson ecotank).

4.5.4 Estimativa das massas moleculares

Para a estimativa das massas moleculares foi usado uma régua para medir a distância em centímetros de cada banda no gel. Os valores foram plotados em um gráfico do log da massa molecular relativa das proteínas versus a migração relativa (cm) durante a eletroforese.

5. Secagem do gel

Os géis foram secos para a sua preservação a longo prazo utilizando uma solução secante (metanol 40%, glicerol 1% e água destilada) e papel celofane. Os papéis foram medidos mergulhados na solução secante por 3 horas, sendo realizado o mesmo procedimento com o gel. Após essas 3 horas, uma das metades do papel foi aplicada em uma placa de vidro, seguido do gel e por fim a outra metade. As extremidades foram seladas e fixadas, deixando o gel em repouso por 24 horas.

6. Perfil cromatográfico do extrato proteico do muco

Para realização da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em fase reversa, foi utilizado um equipamento modelo UltiMate 3000 XRS (Thermo Scientific®) com sistema de injeção automático e uma coluna analítica C18 Symmetry (6 x 75 mm e 3,5 µm). Duas soluções de trabalho foram preparadas, sendo a solução A composta de ácido trifluoroacético 0,1% e a solução B uma mistura de 90% acetonitrila e 10% solução A. Um total de 11 µg de extrato proteico do muco liofilizado foi solubilizado em 100 µL de solução A, depositada em um tubo apropriado e colocado na bandeja de injeção. A cromatografia foi realizada com um fluxo de 1 mL por minuto, iniciando com 5% de solução B por 5 minutos, seguido de um gradiente de 5% a 95% de solução B em 25 minutos, posteriormente permaneceu em 95% de solução B por mais 5 minutos e por fim mais 5 minutos de 5% de solução B, totalizando ao total 40 minutos de corrida cromatográfica. Este ensaio foi realizado com a supervisão da Dra. Ana Cristina Jacobowski no Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB) – FACFAN (UFMS).

5-RESULTADOS

5.1.Dosagem de proteínas do extrato proteico do muco e do ferrão

S1 apresentou uma concentração de proteínas de 1,037mg/mL e S2 apresentou uma concentração de proteínas de 0,725mg/mL. As amostras denominadas S1 e S2 foram misturadas, resultando em uma concentração de proteínas de 1,202mg/mL sendo denominada de pool. O valor da concentração de proteínas obtido para o pool é maior do que os valores dos dois sobrenadantes separados. Com relação ao ferrão, a concentração de proteínas foi de 0,816mg/mL. Assim pode-se observar que o extrato proteico do muco tem uma concentração maior que o extrato protéico ferrão.

5.2.Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Primeiramente, foi feito um gel de 12% (Figura 13), com as frações do extrato proteico do muco foram fracionados em gel SDS-PAGE 12% (Figura 13) sendo possível observar a presença de 3 bandas de massa molecular semelhantes em S1 (25µg), S2 e S1 (50µg). Em S1 (25µg) foi observado uma 4ª banda, aparentemente de menor massa. A banda 2 em S1 (25µg e 50µg) é mais intensa que as demais bandas. S1 e S2 apresentam perfis proteicos semelhantes e mesmo aumentando-se a quantidade de proteínas em S1 (50µg), não foi possível visualizar novas bandas proteicas, mostrando que uma maior concentração de proteínas dificulta a visualização de bandas de baixa massa molecular. Como o gel de 12% foi pouco resolutivo, na tentativa de melhorar a visualização das bandas proteicas, foram testados outros 3 géis em porcentagens diferentes, para definir qual gel permitiria uma melhor visualização do perfil protéico. O marcador de massa molecular não foi utilizado nestes ensaios iniciais.

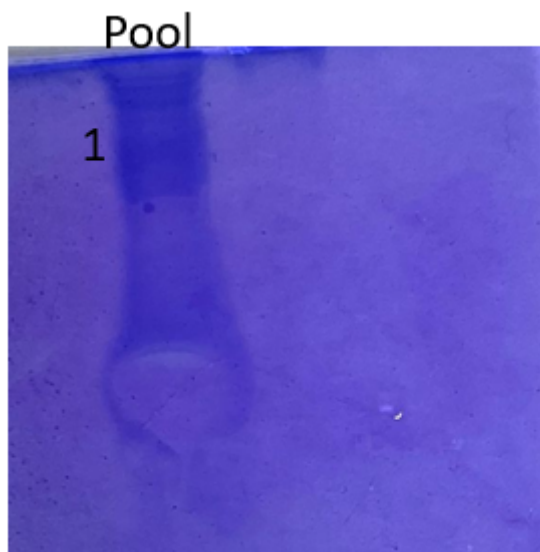
FIGURA 13: Perfil protéico do extrato do muco em SDS-PAGE. Gel de poliacrilamida 12%. Da esquerda para a direita tem-se respectivamente S1(25µg), S2 (25µg) e S1(50µg).



Fonte: AUTORA

O gel de 20% (figura 14) também foi pouco resolutivo, a amostra Pool (S1+S2 10µg) foi utilizada podendo observar apenas 1 banda difusa no gel. Acima da banda difusa, indicada por 1, é possível observar outras bandas que não foram eficientemente separadas. Como o marcador não foi utilizado, não é possível determinar a massa das bandas.

FIGURA 14: Perfil protéico do extrato do muco em SDS-PAGE. Gel de poliacrilamida 20% (10µg Pool S1+S2).

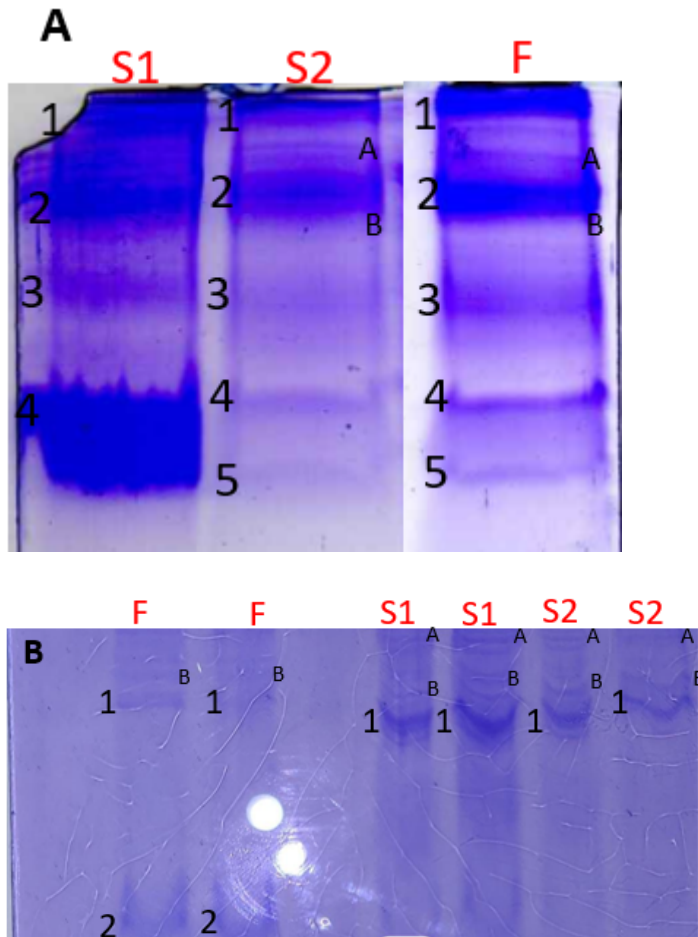


Fonte: AUTORA.

Foi feito um gel avaliando o perfil protéico do extrato do muco e ferrão em SDS-PAGE utilizando-se um gel de concentração de 15% (Figura 15). Os poços utilizados nos géis também são diferentes, para A foi utilizado o poço maior (80 μ L) e em B (40 μ L) o poço menor. Os diferentes tamanhos de poços nos géis de eletroforese são utilizados para acomodar volumes variados de amostras. O tamanho do poço afeta a resolução da separação e a quantidade de amostra que pode ser analisada.

É possível observar a presença de bandas com migração semelhantes entre as amostras (S1, S2 e ferrão 15 μ g). Na figura 15 A, as bandas de 1 a 3 e A-B, aparentemente apresentam alta massa molecular, enquanto as banda número 4 e 5 apresentam baixa massa molecular. Com exceção da banda 3, todas as outras bandas são mais intensas. As bandas 2 (todas) e 4 (de S1) da figura 15 A, são mais intensas que as demais bandas. S2 e F compartilham o mesmo perfil protéico apresentando bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, A e B. É visível, que no gel da Figura 15 B, todas as amostras apresentam aproximadamente bandas (banda 1, A e B) de alta massa similares, porém é somente no extrato proteico do ferrão que conseguimos observar bandas de baixa massa (banda 2). O perfil do extrato proteico do muco é o único que apresenta bandas A, o ferrão apresenta somente B. Em ambas as figuras, quase todas as amostras apresentam a banda 1 intensa, com exceção do extrato proteico do ferrão da figura B. Em ambos os géis não foram utilizados marcadores.

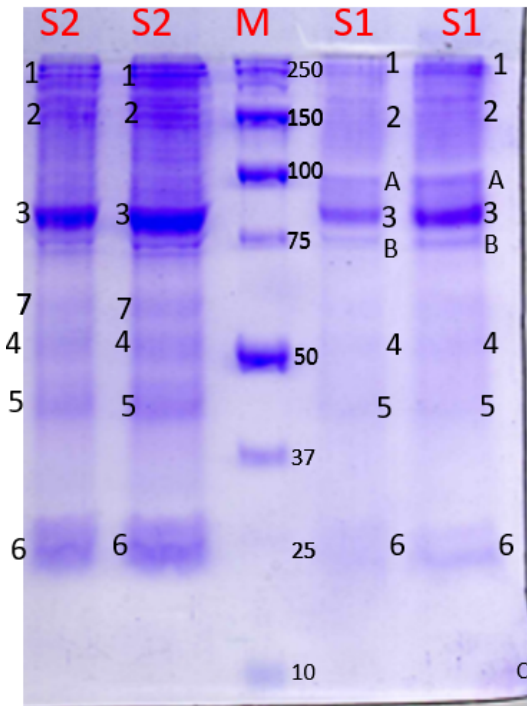
FIGURA 15: Perfis protéicos dos extratos do muco e ferrão em SDS-PAGE. (A)- Gel de poliacrilamida 15% corado com Coomassie, da esquerda para a direita tem-se respectivamente S1; S2; e F1. Foi utilizado 50 µg de proteína (B)- Gel de poliacrilamida 15%, da esquerda para a direita tem-se respectivamente F, S1 e S2. F (10µg e 15µg); S1 (10µg e 15µg) e S2 (10µg e 15µg).



Fonte: AUTORA.

O gel de 15% foi escolhido para avaliar o perfil do extrato proteico do muco (Figura 16), utilizando marcador de massa molecular. As amostras utilizadas foram respectivamente S2 (15µg e 10µg) e S1 (15µg e 10µg). Em ambas é possível visualizar bandas de 250 (banda 1), 150 (banda 2), 80 (banda 3), 56 (banda 4), 44 (banda 5), 25 kDa (banda 6). Somente em S1 é possível visualizar as bandas A e B que correspondem a 96 kDa e 75 kDa, respectivamente, além de uma banda C de 10 kDa. Diferente de S1, S2 apresenta a banda 7 que corresponde a 60 kDa. É possível observar que todas as bandas 3 (de todas as amostras) são mais intensas do que as outras bandas. As bandas 1 de S2 são mais intensas que as de S1.

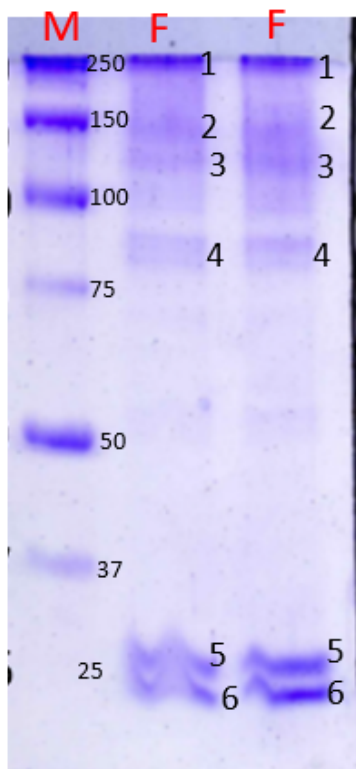
FIGURA 16: A- Perfil protéico do extrato proteico do muco em SDS-PAGE da arraia *Potamotrygon motoro* . Gel de poliacrilamida 15%, da esquerda para a direita sendo S2 (10µg e 15µg), M o marcador, e S1 (10µg e 15µg).



Fonte: AUTORA.

Na figura 17 é possível observar que as duas amostras com quantidades diferentes de proteínas do extrato proteico do ferrão apresentam o mesmo perfil protéico de bandas de alta e baixa massa molecular, sendo encontrados os valores de 250 (banda 1), 151 (banda 2), 138 (banda 3), 80 (banda 4), 23 (banda 5) e 22 kDa (banda 6). As bandas 5 e 6 são bandas difusas e mais intensas que as demais.

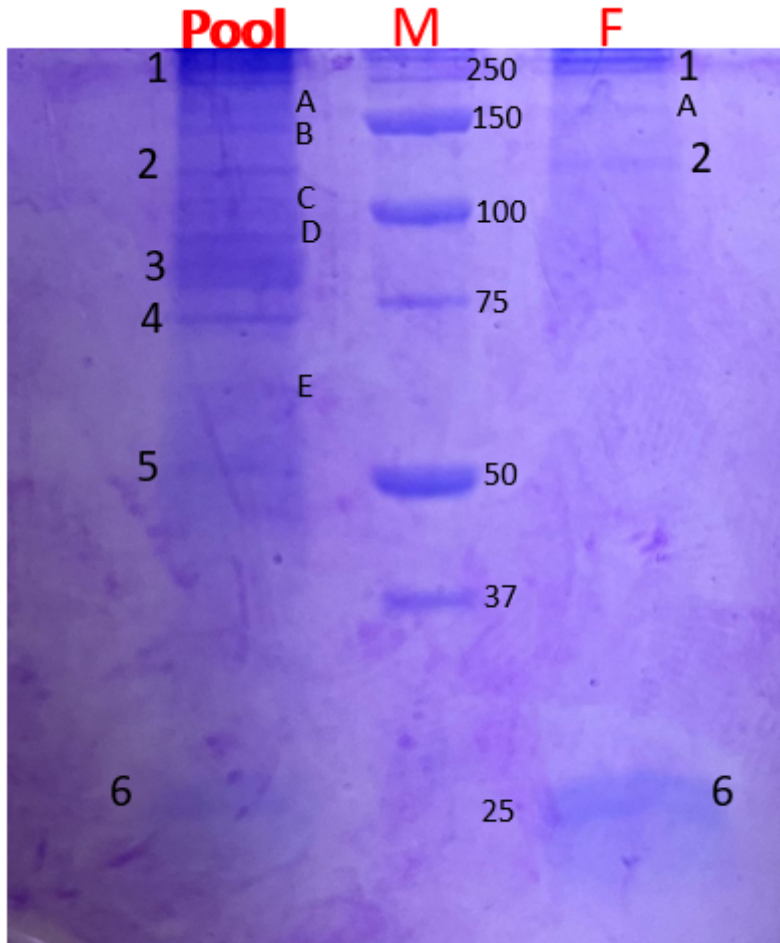
FIGURA 17: Perfil do extrato proteico da peçonha da arraia *Potamotrygon motoro*. Gel de poliacrilamida 15%, sendo da esquerda para a direita o marcador (M) e duas amostras do ferrão (F) em 10 μ g e 15 μ g de proteína.



Fonte: AUTORA

Como as quantidades de proteínas presentes de extrato proteico do muco nas amostras variando entre 10 μ g e 15 μ g apresentaram perfis proteicos semelhantes, optou-se por juntar os dois sobrenadantes resultando em um pool (S1+S2) utilizando apenas 10 μ g de proteína. É notável que a presença do redutor melhora a visualização de bandas do gel. O gel sem o redutor (Figura 18) apresenta bandas menos intensas do que os outros géis (Figuras, 16 e 17) cujas proteínas foram reduzidas com β -mercaptoetanol. Podemos observar 4 bandas em comum para o extrato proteico do muco e do ferrão, sendo essas as bandas 1 (250kDa), 2(140 kDa), 6 (15 kDa) e banda A (191 kDa) As demais bandas do extrato proteico do muco na ausência de redutor são de 167 (banda B), 136 (banda C), 97 (banda D), 76-75 kDa (banda 3 e 4), 53-50 kDa (banda E, banda 5). O gel com o redutor possibilitou a visualização de novas bandas, antes não detectadas no gel com redutor. Para o perfil do extrato proteico do ferrão no gel sem redutor, é possível observar as bandas de 250, 150, 140 e 25 kDa, comparando com o gel com o redutor, a única banda que não apareceu foi de 80 kDa.

FIGURA 18: Perfil eletroforético do extrato proteico do muco e do ferrão em SDS-PAGE da arraia *Potamotrygon motoro*. Gel de poliacrilamida 15% corado com Coomassie, sendo da esquerda para a direita, pool (S1+S2 10 µg), marcador (M) o ferrão (10 µg). As amostras não contêm o agente redutor.



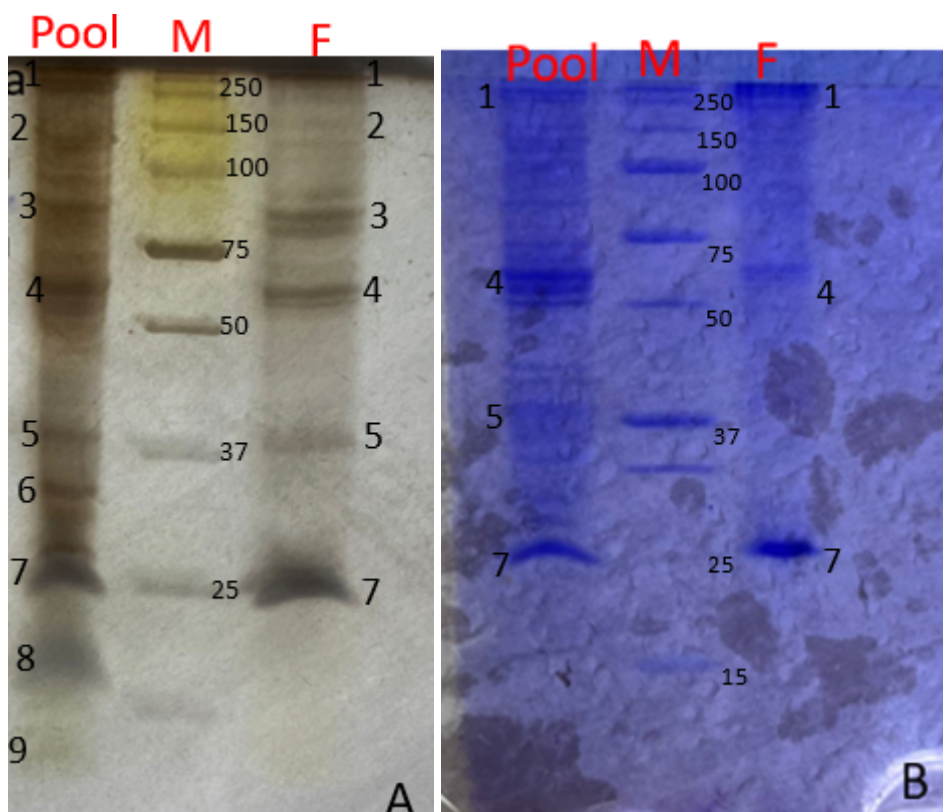
Fonte: AUTORA.

5.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas de baixa massa molecular

Na figura 19, o gel corado com prata, podemos observar a presença de 9 bandas para o extrato proteico do muco e 6 bandas para o extrato proteico do ferrão. No extrato proteico do muco existem bandas de 250 (banda 1), 150 (banda 2), 93 (banda 3), 75 (banda 4), 38 (banda 5), 31 (banda 6), 22 (banda 7), 15 (banda 8) e 11 kDa (banda 9) enquanto no extrato proteico do ferrão existem bandas de 250 (banda 1), 150 (banda 2), 93 (banda 3), 75 (banda 4), 38 (banda 5), 22 (banda 7). Na figura 18 B, com relação ao gel corado com coomassie, no extrato proteico do muco é possível visualizar apenas 4 bandas, sendo essas de 250 (banda 1), 60 (banda 4), 42 (banda 5) e 18 kDa (banda 7). Já no extrato do ferrão, conseguimos observar bandas de 250 (banda 1), 60 (banda 4) e 22

kDa (banda 7). Em ambos os géis e amostras, há a presença da banda 1. Somente no gel corado com prata foi possível a visualização de bandas menores que 15 kDa e tais bandas são mais intensas do que o gel corado com comassie.

FIGURA 19: Avaliação do perfil eletroforético do extrato proteico do muco e do ferrão em SDS-PAGE sistema tricina, da arraia *Potamotrygon motoro* (A)- Gel de poliacrilamida 16,5% corado com prata. Da esquerda para a direita, temos respectivamente o extrato proteico do muco pool (S1+S2) , marcador (M) e ferrão. (B)- Gel de poliacrilamida 16,5% corado com Coomassie. Da esquerda para a direita temos respectivamente o extrato proteico do muco pool, marcador (M) e ferrão. As amostras estão na presença do agente redutor.



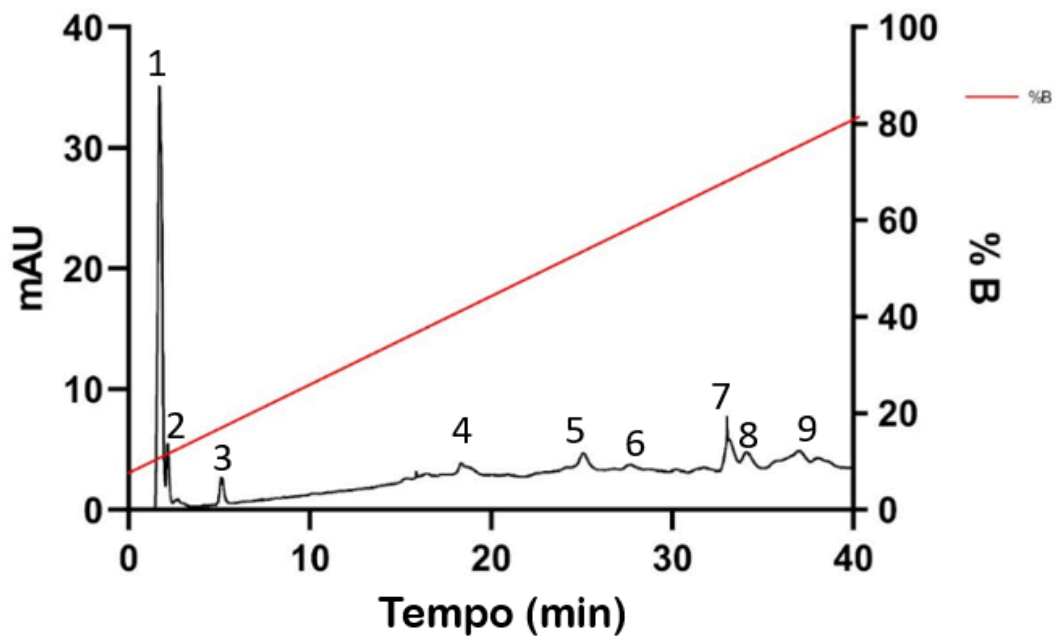
Fonte: AUTORA.

5.4. Fracionamento do extrato proteico do muco por cromatografia

Foi realizada uma cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), para avaliar o perfil cromatográfico do muco. Podemos observar a presença de 9 picos, sendo os picos de 2-9 indicando a presença de compostos em menor quantidade na peçonha. Já o pico 1, o pico mais alto, ou seja maior intensidade de absorbância, sugere o predomínio deste composto de natureza hidrofílica (baixo tempo de retenção) e também baixa massa

molecular, provavelmente é um peptídeo.

FIGURA 20: Perfil cromatográfico do muco liofilizado da arraia *Potamotrygon motoro*, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), com um gradiente de 5% a 80% de solução B. Os números de 1 a 9 indicam o número do pico.



Fonte: AUTORA

6-DISCUSSÃO

Os acidentes associados a dor severa, necrose, rabdomiólise sistêmica e edema, caracterizam as ferroadas das arraias. Ainda não há um tratamento adequado, nem existem soros, porque grande parte dos acidentes não são reportados aos profissionais da saúde e assim, o número acaba sendo estatisticamente insignificante para a produção de um soro (HADDAD, 2004; MAGALHÃES *et al.*, 2006; GARRONE NETO; HADDAD JR., 2010). Embora existam alguns relatos na literatura sobre a composição bioquímica do muco e da peçonha de arraias, é notável que ainda existem muitas moléculas que precisam ser identificadas. Entretanto, tanto o muco quanto a peçonha apresentam componentes que são termolábeis e isso acaba dificultando a continuação dos estudos (MONTEIRO-DOS-SANTOS *et al.*, 2012; BAUMANN *et al.*, 2014; AIRES, 2018). Além disso, a captura de arraias é um processo complicado, sendo necessárias redes de pesca e o horário ideal para captura é no período noturno, uma vez que esses animais possuem hábitos noturnos, além de serem bentônicos, intensificando a dificuldade de captura, pois existe a possibilidade de pisar no dorso acidentalmente (HADDAD, 2004; HADDAD, 2008).

MAGALHÃES e colaboradores (2006), investigando os componentes protéicos da peçonha de peixes da espécie *Potamotrygon* revelou uma banda difusa com massa molecular em torno de 15 kDa em condições não redutoras, observada na eletroforese em gel de SDS-PAGE tanto para a peçonha de *Potamotrygon scobina* quanto para *Potamotrygon orbignyi*. No entanto, na peçonha de *Potamotrygon orbignyi* foram identificadas bandas exclusivas com massas moleculares de 66,2 kDa e 25 kDa. Em um estudo realizado por OLIVEIRA, (2013) foi possível observar a predominância de proteínas de baixa massa molecular nos extratos proteicos do ferrão da arraia *Plesiotrygon iwamae*. As massas moleculares estimadas são de aproximadamente 20,82 kDa e 22,85 kDa, sobre condições não redutoras. Em nosso trabalho, podemos observar também a presença de proteínas de 22-25 kDa, para ambas as amostras.

No estudo realizado com o extrato proteico do ferrão de arraias da espécie *Potamotrygon falkneri* por BÁRBARO, (2007) é possível observar uma banda de 18 kDa, além da banda de 22kDa, e bandas entre 43 e 65 kDa. Estudos realizados por HADDAD Jr. e colaboradores (2004), analisaram o perfil eletroforético do extrato

proteico do ferrão também da espécie *P. falkeni* e puderam constatar a presença de bandas em 12 kDa, bandas em 15, 29, aproximadamente 40 e 60 kDa e bandas entre 16 e 22 kDa. É importante ressaltar que em um estudo realizado por MONTEIRO-DOS-SANTOS *et al.*, 2019, com a peçonha de arraia *Potamotrygon rex*, é possível visualizar 5 bandas, sendo essas de 15 kDa, uma entre 35 e 45 kDa, aproximadamente duas entre 45 e 50 kDa e a última banda por volta de 75 kDa. No presente trabalho conseguimos visualizar bandas no extrato proteico do ferrão de 22-25, 38, 60 e 75 kDa.

Em nosso trabalho, no extrato proteico do muco podemos observar bandas de 250 (banda 1), 140 (banda 2), 76 (banda 3), 75 (banda 4), 50 (banda 5) e 15 kDa (banda 6). Comparando com o trabalho realizado por LAMEIRAS (2013) com arraias da espécie *Potamotrygon motoro*, é possível observar bandas no extrato proteico do muco de 100 kDa, 58 kDa, 41 kDa, 27 kDa, 20 kDa e 15 kDa. A banda de número 5 é semelhante a banda de 50 kDa encontrada em seu trabalho para o extrato proteico do muco. No trabalho de AIRES (2018), foi possível visualizar a presença de bandas de 18, 35, 45 e 66 kDa, no extrato proteico do muco da arraia *Paratrygon aireba*, sendo a banda de 45 kDa valor próximo para as bandas do extrato proteico do ferrão de 44 kDa (figura 16) e 38 kDa (figura 19) no presente trabalho. Também conseguimos observar bandas de 10-15, 22-25 e 56-60 kDa.

MAGALHÃES e colaboradores (2008), estudaram a peçonha bruta de *P. motoro*, e foi possível observar uma banda em 79 kDa. O componente foi identificado e isolado, sendo este uma hialuronidase. No presente trabalho a banda do extrato proteico do ferrão e do muco de 75-80 kDa, é similar a encontrada por esses autores, sendo indício de que esta possa ser uma hialuronidase também.

OLIVEIRA, 2014, constatou a presença de transcritos de fosfolipase A₂ na peçonha das arraias *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon falkneri*. Em seu trabalho MAGALHÃES, (2001) e OLIVEIRA, 2013 detectaram atividade fosfolipásica na peçonha de *Potamotrygon motoro* e *Plesiotrygon iwamae*. MONTEIRO-DOS-SANTOS *et al.* (2011), descreveram bandas de 15, 18, 40 e 50 kDa para a peçonha de *Potamotrygon henlei*. Mesmo não sendo a mesma espécie de arraia do presente estudo, essas fazem parte do mesmo gênero. A massa de 40 kDa é semelhante a banda de 38 kDa (banda 5, extrato proteico do ferrão) encontrada no presente trabalho e a banda de

18kDa, é próxima a de 22 kDa (Figura 19 extrato proteico do ferrão). Também existem bandas de 140, 150 e 250 kDa, podendo ser uma fosfolipase.

Em seu trabalho, LAMEIRAS, (2014) reforça o indício da presença de componentes proteolíticos que apresentam ação de degradação da matriz extracelular, além da presença de fosfolipases, que atuam agravando o quadro clínico de necrose. Os acidentes associados a dor severa, necrose, rabdomiólise sistêmica e edema, caracterizam as ferroadas das arraias. No presente trabalho há evidências de bandas de 38, 44, 50, 56 e 60 kDa (Figuras 16; 18 e 19A).

Um estudo realizado por OLIVEIRA JR, (2014) sobre o transcriptoma do epitélio tegumentar que recobre o ferrão das arraias *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon falkneri* foi possível evidenciar enzimas proteolíticas do tipo metaloproteinases como colagenase, gelatinase, desintegrinas, entre outras, corroborando para o desenvolvimento dos quadros clínicos da necrose. No presente trabalho, é possível a visualização de bandas em 60, 75-76, 80 e 93-96 kDa.

Nos transcritos do extrato proteico do ferrão das arraias *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon falkneri* foi possível evidenciar L-aminoácido oxidases (OLIVEIRA, 2014). No presente trabalho podemos observar bandas entre 136-140 e 150-151 kDa, no extrato proteico do ferrão.

CONCEIÇÃO e colaboradores (2006) descreveram a identificação de um peptídeo vasoconstritor, denominado Orpotrin, isolado da peçonha da arraia brasileira *Potamotrygon orbignyi*. O Orpotrin destaca-se por ser um dos primeiros peptídeos isolados a partir de peçonhas de peixes a apresentar uma atividade vasoconstritora específica. CONCEIÇÃO e colaboradores (2009) identificaram e purificaram um peptídeo bioativo na peçonha da arraia *Potamotrygon orbignyi*, denominado de Porflan, que atua sobre os fosfolipídios da membrana, e pode estar relacionado aos processos inflamatórios observados na lesão decorrentes dos acidentes com arraias. No presente trabalho, foi avaliado o perfil cromatográfico do extrato do muco da arraia *Potamotrygon motoro*, sendo observado o pico 1 e foi eluído em menos de 2 minutos.

AIRES, (2018) conseguiu isolar e identificar um peptídeo presente no muco da arraia *Paratrygon aiereba*, mostrando que este apresenta características como: elevada condutividade, baixa massa molecular, efeito inibitório do crescimento de *Micrococcus luteus*, que são semelhantes ao peptídeo β -defensina. É importante acrescentar que

alguns peptídeos β -defensinas podem apresentar ação inflamatória (CORRÊA, 2013), contribuindo para a gravidade dos acidentes. Este foi o primeiro relato na literatura sobre a existência deste peptídeo β -defensina em arraías, anteriormente foi identificado em peçonha de serpentes (RÁDIS-BAPTISTA *et al.*, 2004) e em *Danio rerio*, popularmente conhecido como peixe-zebra (ZOU *et al.*, 2007). No presente trabalho, conseguimos observar no perfil protéico do extrato do muco uma banda de 11 kDa (Figura 19 A), possivelmente é um peptídeo.

Embora não houve a realização de ensaios para detectar atividades proteolíticas devido a dificuldades de obtenção dos espécimes vivos, os dados existentes na literatura para correlacionar com este trabalho revelaram algumas dessas atividades (quadro 3).

QUADRO 3: Relação das espécies de arraías de água doce da família Potamotrygonidae e as atividades enzimáticas identificadas na peçonha e/ou muco.

Espécie	Atividades Proteolíticas	Referência
<i>Potamotrygon falkneri</i>	Peçonha: Caseinolítica Gelatinolítica Hialuronidásica Fibrinogenolítica Fosfolipásica	BÁRBARO <i>et al.</i> , (2007) HADDAD JR <i>et al.</i> , (2004) MAGALHÃES, (2017)
<i>Potamotrygon motoro</i>	Muco/Peçonha: Gelatinolítica Peçonha: Hialuronidásica 79 kDa (isolada)	LAMEIRAS <i>et al.</i> , (2013) MAGALHÃES <i>et al.</i> , (2008)
<i>Potamotrygon henlei</i>	Peçonha: Gelatinolítica	MONTEIRO-DOS-S ANTOS <i>et al.</i> , (2011)

Espécie	Atividades Proteolíticas	Referência
<i>Paratrygon aiereba</i>	Peçonha: Gelatinolítica	AIRES, (2018)
<i>Plesiotrygon iwamae</i>	Peçonha/muco: Gelatinolítica Fosfolipásica Caseinolítica	LAMEIRAS <i>et al.</i> , (2014) OLIVEIRA, (2013)

Dentro do espectro de análise de proteínas no perfil eletroforético, é importante notar que uma única banda identificada em um gel de eletroforese não necessariamente representa uma única proteína. Frequentemente, proteínas distintas que compartilham massas moleculares similares podem co-migrar, resultando em uma banda única no gel. Esse fenômeno pode ocorrer devido à sobreposição das massas moleculares de diferentes proteínas ou devido a modificações pós-traducionais que alteram ligeiramente o tamanho da proteína sem afetar significativamente sua mobilidade eletroforética. Dessa forma, o quadro 4 relaciona as massas moleculares determinadas pelo perfil de migração com prováveis proteínas ou peptídeos.

QUADRO 4: Relação das bandas identificadas no perfil proteico com as proteínas de massa semelhante descritas na literatura.

Bandas	Proteína/Peptídeo	Referência
10-15 kDa	Fosfolipase Peptídeos Lectinas	SIX e DENNIS, 2000 MUKHERJEE, 2014 VARKI <i>et al.</i> , 2015
22-25kDa	Serinoproteases Metaloproteinases Lectinas	MURAKAMI e ARNI, 2003 SAJEVIC <i>et al.</i> , 2011 VARKI <i>et al.</i> , 2015

31-38 kDa	Serinoproteases Metaloproteinasas Lectinas	MURAKAMI e ARNI, 2003 SAJEVIC <i>et al.</i> , 2011 VARKI <i>et al.</i> , 2015
42-44 kDa	Serinoproteases Metaloproteinasas Lectinas	MURAKAMI e ARNI, 2003 SAJEVIC <i>et al.</i> , 2011 VARKI <i>et al.</i> , 2015
50, 56-60 kDa	Serinoproteases Metaloproteinasas Lectinas	MURAKAMI e ARNI, 2003 SAJEVIC <i>et al.</i> , 2011 VARKI <i>et al.</i> , 2015
75-80 kDa	Metaloproteinasas Hialuronidase	SAJEVIC <i>et al.</i> , 2011
93-96 kDa	Metaloproteinasas	SAJEVIC <i>et al.</i> , 2011
150-167 kDa	L-aminoácidos oxidases	COSTA <i>et al.</i> , 2015
250 kDa	Fosfolipase	SIX e DENNIS, 2000 MUKHERJEE, 2014

PEDROSO e colaboradores (2007) afirmam que existem dois tipos diferentes de células secretoras de proteínas, para arraias de água doce. Essas células são mais abundantes na bainha do tegumento que recobre o ferrão, sendo distribuídas por toda a sua epiderme. Eles apontam que em arraias marinhas, essas células secretoras estão presentes apenas ao redor ou dentro dos sulcos ventrolaterais, essa seria uma evidência que explicaria a gravidade dos acidentes, pois foram notificados uma maior porcentagem de ferimentos que evoluíram para uma necrose em acidentes, provocados por arraias de água doce que por marinhas. As arraias marinhas e de água doce

apresentam uma variação na composição do muco e da peçonha. Essas diferenças são notáveis quando analisamos o trabalho de BÁRBARO e colaboradores, (2007). A peçonha de *Potamotrygon falkneri* apresenta no seu perfil proteico bandas menos intensas em 17 e 32 kDa, enquanto as bandas de *Dasyatis guttata* são mais intensas. Por outro lado, a banda predominante em *P. falkneri* é de 50 kDa, já a de *Dasyatis guttata* está por volta dos 70 kDa. Ambas apresentam bandas em 120 e 200 kDa. No presente trabalho é possível visualizar bandas de baixa massa molecular, presentes no perfil do extrato proteico do ferrão 22-23 kDa. Também é possível observar bandas de 38, 60 e 75-80 kDa, enfatizando que arraias marinhas e de água doce compartilham bandas semelhantes.

Os perfis proteicos semelhantes do muco e da peçonha de arraias podem estar relacionados à sua composição bioquímica, que desempenha um papel no processo de envenenamento e também está associada às funções imunitárias do animal. As análises proteômicas do muco mostraram a presença de proteínas relacionadas à imunidade, como actina, histonas, hemoglobina e proteínas ribossomais. A atividade investigada incluiu a análise da composição proteica do muco para entender seu papel na imunidade da arraia e seu potencial envolvimento no processo de envenenamento. Além disso, o estudo também abordou o efeito pró-inflamatório do muco, demonstrando que ele induz resposta inflamatória, o que sugere uma função importante na defesa imunológica do animal. Este padrão proteico é similar ao relatado para outros mucos de peixe e peçonha de arraia (COELHO *et al.*, 2019b). O muco da pele de arraias é comparável ao de outros peixes em sua composição proteica, desempenhando papéis semelhantes em funções biológicas e imunológicas. Estudos sobre o muco sobre a pele do salmão Atlântico indicam que ele protege o peixe de fatores ambientais nocivos e é um indicador do estado de saúde do peixe, refletindo estresse, exposição a patógenos e efeitos nutricionais. Isso destaca o potencial do muco epidermal como uma matriz para monitoramento da saúde dos peixes em pesquisas futuras (FAESTE *et al.*, 2020).

Embora estudos anteriores afirmarem que tanto o muco quanto a peçonha apresentam características semelhantes, para AIRES, (2018) a peçonha pode vir a ser mais severa que o muco devido a introdução do aparato inoculador na vítima. Esse acidente mecânico dilacera o tecido, tanto da vítima quanto do ferrão, agravando a intensidade do ferimento que desencadeia a ativação dos processos inflamatórios e nociceptivos. A infecção secundária decorre da dilaceração dos tecidos e são

frequentemente causadas por *Pseudomonas spp.* e *Staphylococcus spp.* que estão presentes no muco ou na água em que o animal habita e adentram no local lesionado (HADDAD JR, 2008). Como já citado anteriormente, existem bactérias Gram-negativas presentes no muco, que são resistentes a antibióticos e causam a hemólise dos eritrócitos, influenciando nessa infecção (DOMINGOS *et al.*, 2007).

O estudo realizado por RIBEIRO NETO e colaboradores (2022) abordou na descrição histológica e histoquímica do tegumento que reveste o dorso e o ferrão da arraia de água doce *Potamotrygon rex*. Este estudo evidencia a atividade do ferrão voltada para a produção de proteínas, enquanto o dorso é estruturado para produzir componentes diversos, constituindo a cutícula que reveste o corpo do animal. A análise histoquímica revelou que o muco é composto por mucopolissacarídeos ácidos e neutros, além de reservas proteicas, indicando uma rica composição que pode ter implicações significativas para a interação da arraia com seu ambiente. Dessa forma, as diferenças quanto a composição do extrato do muco e do ferrão de *P. motoro* sugerem ser decorrentes das diferenças estruturais bem como funcionais da peçonha e do muco.

7-CONCLUSÃO

Neste estudo, foi possível observar a presença de diferentes proteínas no extrato proteico do muco e do ferrão da arraia *Potamotrygon motoro*, apresentando massas moleculares distintas 10-15, 18, 22-25, 31-38, 42-44, 50-60, 75-80, 93-97, 136-140, 150, 167, 191 e 250 kDa. Essas bandas sugerem a presença de peptídeos, fosfolipases, serinoproteases, metaloproteinases, hialuronidases, LAOs e lectinas. A comparação do perfil proteico do muco com o ferrão revelou poucas diferenças. No extrato proteico do ferrão não conseguimos visualizar as bandas de: 15-11, 22, 31, 42, 50-53, 167 kDa, presentes somente no muco. Além disso, como esperado, observou-se uma banda de 75-80 kDa no extrato proteico do ferrão, sugerindo que esta possa ser uma hialuronidase. No extrato proteico do muco, também foi observada essa mesma banda de 75-80 kDa. Por fim, uma molécula de natureza hidrofílica foi detectada por HPLC.

Assim, são necessários mais estudos para o aprofundamento da caracterização bioquímica do muco e do ferrão de *P. motoro*, além da purificação dos componentes para elucidação do papel deles como agentes bioativos e também suas funções no envenenamento. Tais estudos poderão contribuir para a aplicação farmacológica dessas moléculas bem como possibilitar um tratamento mais adequado dos acidentes com arraias, estimulando políticas de saúde pública.

8-REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H., & PILLAI, S. (2020). Cellular and Molecular Immunology (9th ed.). Philadelphia, PA: Elsevier.

AFFONSO, A. Butantan testa soro contra peixes venenosos. Instituto desenvolve antídoto para quatro espécies que podem causar dor intensa em quem se banha em rios e no mar. Saúde Pública, **FAPESP**, 2023

AGOSTINHO, A. A; GOMES, L. C.; ZALEWSKI, M.. The importance of floodplains for the dynamics of fish communities of the Upper Paraná river. **Ecohydrology Hydrobiology**, Łódz, v. 1 n. 1-2, p. 209-217, 2001.

AL-DAMLUJI, S.F. **Organomercury poisoning in Iraq** : History prior to the 1971-1972 outbreak. Bull. WHO, Geneva, v.53 (Suppl.), p. 11-14, 1976.

AL-HASSAN,, J. M.; THOMSON, M.; ALI, M.; FAYAD, S.; ELKHAWAD, A.; THULESIUS, O.; CRIDDLE, R. S. Vasoconstrictor components in the Arabian Gulf catfish (*Arius thalassinus*, Ruppell) proteinaceous skin secretion. **Toxicon**, v. 24, p. 1009-1014, 1986

ALEXANDER, J. B.; INGRAM, G. A. Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, n. 0, p. 249-279, 1992

AIRES, R.S: **Caracterização bioquímica preliminar de toxinas do muco de raia de água doce *Paratrygon aiereba***. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), São Paulo, 2018.

ALMEIDA, W.F.; PREGNOLATTO, W. & PIGATI, P. Misuse of organomercury fungicides in Brazil. Bull. WHO, Geneva, v. 53 (Suppl.), p. 133-138, 1976.

ALMEIDA, M.P; LINS, P.M.O.; CHARVET-ALMEID, P.; BARTHEM, R.B. Diet of the freshwater stingray *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) on Marajó Island (Pará, Brazil). **Journal of Biology**. 2010; 70(1):155-162.

ANTONIAZZI, M. M.; BENVENUTI, L. A.; LIRA, M. S.; JARED, S. G.; NETO, D. G.; JARED, C.; BARBARO, K. C. Histopathological changes induced by extracts from the tissue covering the stingers of *Potamotrygon falkneri* freshwater stingrays. **Toxicon**. v. 57, n. 2, p. 297-303. 2011.

ARAÚJO, M.; CHARVET-ALMEIDA, P.; ALMEIDA, M. P.; PEREIRA, H. Freshwater stingrays (Potamotrygonidae): status, conservation and management challenges. **Information document AC**. v. 20, p. 1-6. 2004.

ARAWAKA, O.; HWANG, D. F.; TANIYAMA, S.; TAKATANI, T. **Toxins of pufferfish that cause human intoxications**. In: Ishimatsu A, Lie HJ, editors. Coastal environmental and ecosystem issues of the East China Sea. Tokyo: Nagasaki University/TERRAPUB; 2010.

BARBARO, K. C.; LIRA, M. S.; MALTA, M. B.; SOARES, S. L.; GARRONE NETO, D.; CARDOSO, J. L.; SANTORO, M. L.; HADDAD JUNIOR, V.: Comparative study on extracts from the tissue covering the stingers of freshwater (*Potamotrygon falkneri*) and marine (*Dasyatis guttata*) stingrays. **Toxicon**. v. 50, n. 5, p. 676-687. 2007.

BAUMANN, K.; CASEWELL, N. R.; ALI, S. A.; JACKSON, T. N.W.; VETTE, I.; DOBSON, J.S.; CUTMORE, S.C.; NOUWENS, A.; LAVERGNE, V.; FRY, B.G. A ray of venom: combined proteomic and transcriptomic investigation of fish venom composition using barb tissue from the blue-spotted stingray (*Neotrygon kuhlii*). **Journal of proteomics**. 109:188-198, 2014.

BERGSSON, G.; AGERBERTH, B.; JORNVALL, H.; GUDMUNDSSON, G. H. Isolation and identification of antimicrobial components from the epidermal mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*). **FEBS J**. 272, 4960–4969, 2005.

BOCHNER, R., STRUCHINER, C. J. Acidentes por animais peçonhentos e sistemas nacionais de informação. **Caderno da Saúde Pública**, v.18, n. 3, p. 735-746, 2002.

BIRKEMO, G. A.; LUDERS, T.; ANDERSEN, Ø.; NES, I. F.; NISSEN-MEYER, J. Hippisin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus*

hippoglossus L.). **Biochimica et Biophysica. Acta (BBA)-Proteins Proteomic**. 1646, 207–215, 2003

BORGES, M. H.; ANDRICH, F.; LEMOS, P. H.; SOARES, T. G.; MENEZES, T. N. CAMPOS, F. V.; NEVES, L. X.; CASTRO-BORGES, W.; FIGUEIREDO, S. G. Combined proteomic and functional analysis reveals rich sources of protein diversity in skin mucus and venom from the *Scorpaena plumieri* fish. **Journal of Proteomics** V.187, p.200-211, 2018.

BROOKS, D. R. Hennig's parasitological method: A proposed solution. **Systematic Zoology** 30: 229-249.

BROOKS, D. R. Origins, diversification, and historical structure of the helminth fauna inhabiting neotropical freshwater stingrays (Potamotrygonidae). **The Journal of parasitology**. p. 588-595. 1992.

BUCARETCHI, F.; LUCAS, S. M.; JÚNIOR, P. I. S.; DIAS, L. B.; NETO, H. F.; JÚNIOR, D. C.; LEÃO, R. N. Q.; BALLARINI, A. J.; PARDAL, P. P. O.; ARAÚJO, F. A.; RESENDE, C. C.; PAULA, M. A. Ictismo. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. SAÚDE/ASCOM/PRE/FUNASA, A. D. C. E. E. E. Brasília. 81-85 p. 2001.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 5, p. 278–254, 1976.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 7.ed.. Brasília, DF, 2009. 813 p.

BUTANTAN. **Série Didática**. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenadoria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos de Saúde. Instituto Butantan, São Paulo/SP. s/d.

CARRIJO, L. C.; ANDRICH, F.; LIMA, M. E.; CORDEIRO, M. N., RICHARDSON, M. FIGUEIREDO, S. G. Biological properties of the venom from the scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) and purification of a gelatinolytic protease. **Toxicon**.v. 45 p.843-850, 2005.

CARVALHO, M. D.; LOVEJOY, N. Morphology and phylogenetic relationships of a remarkable new genus and two new species of the Neotropical freshwater stingrays from the Amazon basin (Chondrichthies: Potamotrygonidae) **Zootaxa**, 2776, p. 13-48, 2011.

CARVALHO, M. D.; LOVEJOY, N.; ROSA, R.: **Family Potamotrygonidae (river stingrays). Checklist of the freshwater fishes of South and Central America** (RE Reis, SO Kullander & CJ Ferraris Jr., eds.). EDIPUCRS, Porto Alegre. p. 22-28. 2003.

CASTEX, M. N. Observaciones sobre la raya de río *Potamotrygon motoro* (Muller y Henle). Com. Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, Hidrobiologia, 1(2): 7-14, 1963.

CASTEX M. N. El género *Potamotrygon* em El Paraná medio. An. Mus. Prov. Cienc. Nat. F. Ameghino, 2(1): 1-86, 1963.

CASTEX, M.N. Observaciones en torno a las formaciones estelares que recubren el dorso de algunas especies de raya de agua dulce (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). **Physis**, 26(73): 485-491, 1967.

CHO, J. H.; PARK, I. Y.; KIM, H. S.; LEE, W. T.; KIM, M. S.; KIM, S. C. Cathepsin D produces antimicrobial peptide parasin I from histone H2A in the skin mucosa of fish. **FASEB J.** 16, 429–431,2002.

CHURCH, J. E., HODSON, W. C. The pharmacological activity of fish venoms. **Toxicon**, v. 40, p. 1083-1093, 2002.

COELHO, G. R.; NETO, P. P.; BARBOSA, F. C. ; DOS SANTOS, R. S. ; BRIGATTE, P. ; SPENCER, P. J. ; SAMPAIO, S. C. ; DAMÉLIO, F. ; PIMENTA, D. C. ; SCIANI, J.

M. Biochemical and biological characterization of the *Hypanus americanus* mucus: A perspective on stingray immunity and toxins. **FISH & SHELLFISH IMMUNOLOGY** , v. 93, p. 832-840, 2019a.

COELHO, G. R. ; PIMENTA, D. C. ; SAMPAIO, S. C. ; SANTOS, R. S. ; SCIANI, J. M. Biochemical composition and inflammatory activity of mucus from *Hypanus americanus* (*Dasyatis americana*) marine stingray. **Toxicon** , v. 158, p. S42, 2019b.

COELHO, G. R. ; NETO, J. É P. P. ; BARBOSA, F. C. ; SANTOS, RAFAEL S ; BRIGATTE, P. ; SPENCER, P. J. ; SAMPAIO, S. C. ; D'AMÉLIO, F. ; PIMENTA, D. C. ; SCIANI, J. M. . *Hypanus americanus* mucus: A new point of view about stingray immunity and toxins. **Toxicon** , v. 177, p. S34, 2020.

COLE, A. M.; WEIS, P.; DIAMOND, G. Isolation and Characterization of Pleurocidin, an Antimicrobial Peptide in the Skin Secretions of Winter Flounder. **Journal of Biological Chemistry** 272, 12008–12013, 1997.

CONCEIÇÃO, K.; MONTEIRO-DOS-SANTOS, J.; SEIBERT, C. S.; SILVA JR, P. I.; MARQUES, E. E.; RICHARDSON, M.; LOPES-FERREIRA, M. *Potamotrygon* cf. *henlei* stingray mucus: Biochemical features of a novel antimicrobial protein. **Toxicon**, v.60, p.221-229, 2012.

COSTA, T. R.; MENALDO, D. L.; PRINHOLATO Da Silva, C.; SORRECHIA, R.; DE ALBUQUERQUE, S.; PIETRO, R. C.; GHISLA, S.; ANTUNES, L. M.; SAMPAIO, S. V. Evaluating the microbicidal, antiparasitic and antitumor effects of CR-LAAO from *Calloselasma rhodostoma* venom. **Int Journal of Biol Macromol.** v. 80, p. 489-97, 2015.

COSTA, J. A; MARTINS, A. P. B; HADDAD, V.; CARVALHO, I. E. M; NUNES, J. L. S; Acidentes causados pela arraia fluvial *Potamotrygon motoro* em comunidades lacustres em Território do bioma Oriental da Amazônia. **Saúde Meio Ambiente.** v. 10, p. 254-265, 2021

COMPAGNO, L.; COOK, S. The exploitation and conservation of freshwater elasmobranchs: status of taxa and prospects for the future. **Journal of Aquaculture and Aquatic Sciences**, 1995.

CONCEIÇÃO, K.; KONNO, K.; MELO, R. L.; MARQUES, E. E.; HIRUMA-LIMA, C. A.; LIMA, C.; RICHARDSON, M.; PIMENTA, D. C.; LOPES-FERREIRA, M. Orpotrin: A novel vasoconstrictor peptide from the venom of the Brazilian Stingray *Potamotrygon* gr. *orbignyi*. **Peptides**. v. 27, n. 12, p. 3039-3046, 2006.

CONCEIÇÃO, K.; SANTOS, J. M.; BRUNI, F. M.; KLITZKE, C. F.; MARQUES, E. E.; BORGES, M. H.; MELO, R. L.; FERNANDEZ, J. H.; LOPES-FERREIRA, M. Characterization of a new bioactive peptide from *Potamotrygon* gr. *orbignyi* freshwater stingray venom. **Peptides**. v. 30, n. 12, p. 2191-2199. 2009.

CONCON, J.M. Contaminants and additives. **Food Toxicology** p. 1371, 1988.

COTTA, G. A. **Animais Peçonhentos**. 5ed. Belo Horizonte: Fundação Ezequiel Dias, 2014.

DEGHANI, H.; SAJJADI, M. M.; PARTO, P.; RAJAIAN, H.; MOKHLESI, A. Histological characterization of the special venom secretory cells in the stinger of rays in the northern waters of Persian Gulf and Oman Sea. **Toxicon**. v. 55, n. 6, p. 1188-1194. 2010.

DENNIS, E. A.; CAO, J.; HSU, Y.-H.; MAGRIOTI, V.; KOKOTOS, G. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chemistry Review**. v. 111, n. 10, p. 6130-6185, 2011.

DÍAZ-PUERTAS, R.; ADAMEK, M.; MALLAVIA, R. FALCO, A. Fish Skin Mucus Extracts: An Underexplored Source of Antimicrobial Agents. Review. **Marine Drugs**, 2023.

DOMINGOS, M. O.; FRANZOLIN, M. R.; DOS ANJOS, M. T.; FRANZOLIN, T. M.; BARBOSA ALBES, R. C.; DE ANDRADE, G. R.; LOPES, R. J.; BARBARO, K. C. The influence of environmental bacteria in freshwater stingray wound-healing. **Toxicon**. v. 58, n. 2, p. 147-153. 2011.

EASY, R. H., & ROSS, N. W. Changes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) epidermal mucus protein composition profiles following infection with sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 4(3), 159-167, 2009.

EKMAN, D. R.; SKELTON, D. M.; DAVIS, J. M.; VILLENEUVE, D. L.; CAVALLIN, J. E.; SCHOROEDER, A.; JENSEN, K. M.; ANKLEY, G.T.; COLLETTE, T. W. Metabolite Profiling of Fish Skin Mucus: A Novel Approach for Minimally-Invasive Environmental Exposure Monitoring and Surveillance. **Environ. Science Technology**. 2015, 49, 3091–3100.

FACÓ, P. E. **Epidemiologia dos acidentes causados por *Thalassophrytte nattereri* (niquim) no Estado do Ceará e Estudo dos efeitos do veneno em rim isolado**. Dissertação. Fortaleza-Ceará, 2003

FACÓ, P. E.; BEZERRA, G. P.; BARBOSA, P. Epidemiologia dos acidentes por *Thalassophryne nattereri* (niquim) no Estado do Ceará (1992-2002). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*., v. 38, p.479-482, 2005.

FAESTE, C. K.; TARTOR, H.; KRISTOFFERSEN, A. B.; DHANASIRI, A. K. S.; ANONSEN, H.; FURMANEK, T.; GROVE, S. Proteomic profiling of salmon skin mucus for the comparison of sampling methods. **Journal of Chromatography B Analytics and Technology Biomed Life Sci**, 2020.

FERNANDES, J. M .O.; SMITH, V. J. A novel antimicrobial function for a ribosomal peptide from rainbow trout skin. **Biochemica et Biophysica Res. Commun.**296, 167–171, 2002.

FERNANDES, J. M .O.; SAINT, N.; KEMP, G. D.;SMITH, V. J. Oncorhyncin III: A potent antimicrobial peptide derived from the non-histone chromosomal protein H6 of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Biochemistry Journal.**, 373, 621–628, 2003.

FERNANDES, J. M .O.; MOLLE, G.; KEMP, G. D.; SMITH, V. J Isolation and characterisation of oncorhyncin II, a histone H1-derived antimicrobial peptide from skin secretions of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Development and Comparative Immunology** 28, 127–138, 2004.

FERREIRA, M. L.; FALCÃO, M. A; BRUNI, F. M.; HADDAD JR, V.; MARQUES, E. E.; SEIBERT, C. S.; LIMA, C. Effective pre-clinical treatment of fish envenoming with polyclonal antiserum (<https://www.mdpi.com/1422-0067/24/9/8338>). **International Journal of Molecular Sciences.** v. 24, n. 9. 6 mai, 2023.

FIGUEIREDO, J. L.; MENEZES, N. A. **Manual de Peixes Marinhos do Brasil II. Teleostei (1)**. São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 1978, p. 34-95.

FIOROTTI, H .B. **Caracterização bioquímica e funcional de frações hemaglutinantes da peçonha do peixe escorpião *Scorpaena plumieri***. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas. Vitória, 2020.

FIOROTTI, H. B;. SOARES, T. G.; BORGES, M. H.; MATAVEL, A.; CAMPOS, F. V.; FIGUEIREDO, S. G. Preliminary report on the hemagglutinating activity of the *Scorpaena plumieri* fish venom. **Anais da Academia Brasileira de Ciência.** 94(4), 2022.

FRANCESCHI, A. **Controle ambiental**. Colégio Técnico Ambiental, UFSM, p. 16, 2011.

FRÓES, H. P. Peixes toxíforos do Brasil. **Bahia Médica**, v. 4, p. 69-75, 1933a.

FRÓES, H. P. Studies on venomous fishes of tropical countries. **Journal of Tropical Medicine. Hyg.**, v. 36, p. 134-135, 1933b.

FRÓES, H. P. Estudo experimental sobre o veneno dos niquins (Thalassophrynidæ). **Bahia Médica**, v. 4, p. 225-227, 1933c.

FUOCHI, V.; LI VOLTI, G.; CAMIOLO, G.; TIRALONGO, F.; GIALLONGO C.; DISTEFANO, A.; PETRONIO PETRONIO, G.; BARBAGALLO, I.; VIOLA, M.; FURNERI, P.M.; et al. Antimicrobial and Anti-Proliferative Effects of Skin Mucus Derived from *Dasyatis pastinaca* (Linnaeus, 1758). **Marine Drugs**, 15, 342., 2017

GARRONE NETO, D., CORDEIRO, R.C.; HADDAD Jr., V. Acidentes do trabalho em pescadores artesanais da região do Médio Rio Araguaia, TO, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, vol. 21, n. 3, p. 795-803, 2005.

GARRONE NETO, D.; HADDAD Jr., V.; VIELA, M. J. A, UIEDA, V. S. Registro de ocorrência de duas espécies de potamotrigonídeos na região do Alto Rio Paraná e algumas considerações sobre sua biologia. **Biota Neotropica**. 7(1): 205-08., 2007

GARRONE NETO, D.; HADDAD Jr. V Acidentes por raias., CARDOSO, J. L. C., FRANÇA, F. O. S, WEN, F. H., MÁLAQUE, C. M. S. ;HADDAD Jr. V. Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. 2nd ed. São Paulo: **Sarvier**, p. 295-313, 2009

GARRONE NETO, D.; HADDAD Jr., V. Arraias em rios da região sudeste do Brasil: locais de ocorrência e impactos sobre a população. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 43(1): 82-88., 2010

GUALBERTO, R.M.; MENDONÇA, A.P.; DOS SANTOS, M.C. Uma Contribuição para a Notificação de Acidentes com Arraias: Desenvolvimento de um Sistema Web para Gerir as Notificações. **Journal of Health Informatics**, v. 8, n. 2, 2016.

HADDAD JR, V. Atlas de animais aquáticos perigosos do Brasil: guia médico de identificação e tratamento. São Paulo: **Editora Roca**. p. 145, 2000.

HADDAD Jr V. Animais aquáticos de importância médica no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**,36(5): 591-597, 2003.

HADDAD Jr V, TAKEHARA, E. T., RODRIGUES, D. S., LASTÓRIA, J. C. Envenenamento por baiacus (peixes-bola): revisão sobre o tema. **Diagnostico e Tratamento**; 9:183-185, 2004.

HADDAD Jr V.; GARRONE NETO D.; DE PAULA NETO, J.B.; MARQUES, F. P. L.; BARBARO, K. C. Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 84 envenomings in humans and some enzymatic activities of the venom. **Toxicon**. 43:287–94, 2004

HADDAD JR, V. Animais aquáticos potencialmente perigosos no Brasil: guia médico e biológico. **Editora Roca**, 2008

HADDAD JR, V; CARDOSO, J. L. C, GARRONE NETO, D. Injuries by marine and freshwater stingrays: history, clinical aspects of the envenomations and current status of a neglected problem in Brazil. **Journal of Venom Animals Toxins Incl Tropical Diseases**.19:16–16, 2013.

HADDAD JR, V.; TUBARO, A.; KIM, E.; KEM, W. R. Marine and Freshwater Toxins, **Toxinology**, p. 13-17, 2016.

HALSTEAD, B. W. **Venomous marine animals of Brazil**. Memórias do Instituto Butantã, v. 33, 126p. 1966.

HALSTEAD, B. W. **Poisonous and Venomous Marine Animals of the World: Invertebrates**. US Government Printing Office, 1965.

HALSTEAD, B. W. **Poisonous and venomous marine animals of the world: vertebrates.** Washington, DC: US Government Print, v. 3. 1970.

HUANG, S.; JIA, R.; ZHAI, W.; JIANG, S.; LI, W.; WANG, F.; XU, Q. Specific immunity proteomic profile of the skin mucus of Antarctic fish *Chionodraco hamatus* and *Notothenia coriiceps*. **Journal of Fish Biology.** v.99, p.1998-2007, 2021.

ISHIZUKA, E. K. **Modulação da função de macrófagos pela nattectina: Uma lectina tipo C do veneno de *Thalassophryne nattereri*.** Dissertação. São Paulo, 2011.

JOHNSTON, J.N. & SAVAGE, G.P. Mercury consumption and toxicity with reference to fish and fish meal. **Nutrition Abstracts and Reviews.** (Series A), Slough, v. 61, n. 2, p. 73-116, 1991.

JUNQUEIRA, M.E.; GRUND, L.Z.; ORII, N.M.; SARAIVA, T.C.; DE MAGALHÃES LOPES, C.A.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Analysis of the inflammatory reaction induced by catfish (*Cathrops spixii*) venoms. **Toxicon**, v. 49, p. 909-19, 2007.

KITAHARA, S. E. **Contaminação de pescados de água doce por mercúrio,** 2000.

KLESZIUS, P. H.; SHOEMAKER, C. A.; EVANS, J. J. **Flavobacterium columnare chemotaxis to channel catfish mucus.** FEMS Microbiology Letters, v. 288, n. 2, p. 216-220, 2008.

KOLMANN, M. A.; MARQUES, F. P. L.; WEAVER, J. C.; DEAN, M. N.; FONTENELLE, J. P.; LOVEJOY, N. R. Ecological and Phenotypic Diversification after a Continental Invasion in Neotropical Freshwater Stingrays. **Integrative and Comparative Biology**, volume 62, number 2, pp. 424–440, 2022.

KUMAR, K. R.; VENNILA, R.; KANCHANA, S.; ARUMUMGAM, M.; BALASUBRAMANIAM, T. Fibrinogenolytic and anticoagulant activities in the tissue covering the stingers of marine stingrays *Dasyatis sephen* and *Aetobatis narinari*. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 31, p. 464–471, 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature Publishing Group**, v. 228, p. 1979, 1970.

LAMEIRAS, J. V. **PERFIS PROTEICOS, ENZIMÁTICOS E MIOTOXICIDADE INDUZIDOS PELOS VENENOS DAS ARRAIAS AMAZÔNICAS *Plesiotrygon iwamae* Rosa, Castello & Thorson, 1987 E *Potamotrygon motoro* Müller & Henle, 1841 (Chondrichthyes – Potamotrygonidae)**. Dissertação. Manaus, 2013

LAMEIRAS, J. V.; COSTA, O. T. F. D.; MORONI, F. T.; ARAÚJO, J. D. R.; CARANHAS, S. M. E.; MARQUES, C. M. A.; DOS-SANTOS, M. C.; DUNCAN, W. L. P. Systemic rhabdomyolysis induced by venom of freshwater stingrays *Plesiotrygon iwamae* and *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes–Potamotrygonidae) from the Amazon Basin. **Toxicon**. v. 77, p. 105-113. 2014.

LAMEIRAS, J. V., MOURA, V. M., DIAS, L. C.; SANTOS, I. G. C.; COSTA, O. T. F., DOS-SANTOS, M. C. Cross-reactivity between *Potamotrygon motoro* antivenoms and dorsal and stinger extracts of others stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from the Amazon basin. **Toxin Reviews** 36(0), 1-10, 2017

LAZAROVICI, P.; PRIMOR, N.; LOEW, L. M. Purification and pore-forming activity of two hydrophobic polypeptides from the secretion of the Red Sea Moses sole (*Pardachirus marmoratus*). **Journal of Biological Chemistry**. 261, 16704–16713, 1986.

LIMA, L. A. F. D.; FERREIRA, M. L.: Estudo clínico e experimental sobre o envenenamento causado pelo peixe *Thalassophryne nattereri* (niquim); Clinical and experimental studies regarding poisoning caused by a fish *Thalassophryne nattereri* (niquim). **Anais brasileiros de dermatologia** v. 75, n. 4, p. 435-443. 2000.

LIMA, P. G. **Peptídeos antimicrobianos sintéticos: atividade antifúngica e mecanismos de ação**. 2021. 116 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

LOBODA, T. S. **Delimitação taxonômica de Potamotrygon motoro Müller & Henle, 1841 na bacia Paraná-Paraguai (Chondrichthyes: Potamotrygonidae)**. Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filos. Ciência e Letras de Ribeirão Preto da Univ. de São Paulo. Ribeirão Preto. 75p., 2006

LOBODA, T. S. **Revisão taxonômica e morfológica de Potamotrygon motoro (Müller & Henle, 1841) na bacia Amazônica (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae)**. Dissertação, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 305p., 2010.

LOBODA, T. S; New records of two ocellated species of the genus *Potamotrygon* Garman, 1877 (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae) for Paraguay and Bolivia. **Ichthyological Contributions of Peces Criollos** 45: 1-8 , 2016.

LOPES-FERREIRA, M.; BARBARO, K. C.; CARDOSO, D. F.; MOURDA-DA-SILVA, A. M.; MOTA, I. Thalassophryne nattereri fish venom: biological and biochemical characterization and serum neutralization of its toxic activities. **Toxicon**, v. 36, p. 405-410, 1998.

LOPES-FERREIRA, M.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; MOTA, I.; TAKEHARA, H. A. : Neutralization of Thalassophryne nattereri (niquim) fish venom by an experimental antivenom. **Toxicon** 38(8):1149–1156, 2000.

LOPES-FERREIRA, M.; NÚÑEZ, J.; RUCAVADO, A.; FARSKY, S. H.; LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; MOURA-DA-SILVA, A. M, GUTIÉRREZ, J. M. : Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of Thalassophryne nattereri (niquim) fish venom in mice. *Int J Exp Pathol*, 82(1):55–64, 2001.

LOPES-FERREIRA, M.; EMIM, J. A.; OLIVEIRA, V.; PUZER, L.; CEZARI, M. H, ARAÚJO, M. S.; JULIANO, L.; LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.S, MOURA-DA-SILVA, A. M. Kininogenase activity of Thalassophryne nattereri fish venom. **Biochemistry Pharmacology**, 68(11):2151–2157, 2004.

LOVEJOY, N. R.; BERMINGHAM, E.; MARTIN, A. P. Marine incursion into South America. **Nature**, v. 396, n. 6710, p. 421-422, 1998.

LOVEJOY, N. R.; ALBERT, J. S.; CRAMPTON, W. G. R. Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: evidence from Neotropical fishes. **Journal of South American Earth Sciences**, 21(2): 5-13, 2006.

LUDERS, T.; BIRKEMO, G. A.; NISSEN-MEYER, J.; ANDERSEN, Ø.; NES, I. F. Proline conformation-dependent antimicrobial activity of a proline-rich histone h1 N-terminal Peptide fragment isolated from the skin mucus of Atlantic salmon. **Antimicrobial Agents Chemother.** 49, 2399–2406, 2005.

MAGALHÃES, M. R. **Estudos bioquímicos do veneno de raias *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes: Dasyatidae, Potamotrygoninae) - Purificação e caracterização de uma hialuronidase.** Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO. 62 p., 2001.

MAGALHÃES, Geraldo Santana. **Análise da expressão gênica da glândula de veneno do peixe *Thalassophryne nattereri*.** Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MAGALHÃES, K. W.; LIMA, C.; Piran-Soares, A. A; MARQUES E. E.; Hiruma-Lima, C. A.; Lopes-Ferreira, M. Biological and biochemical properties of the Brazilian 92 *Potamotrygon* stingrays: *Potamotrygon cf. scobina* and *Potamotrygon gr. orbigny*. **Toxicon**. v. 47, n. 5, p. 575-583, 2006.

MAGALHÃES, M. R. A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (freshwater stingrays) venom: Isolation and characterization. **Toxicon**. v. 51, n. 6, p. 1060-1067. 2008.

MAGALHÃES, M. R. **Caracterização de enzimas em peçonhas animais: identificação de fosfolipases do escorpião *Hadrurus gerstchi* e atividades enzimáticas da arraia *Potamotrygon falkneri*.** Tese. Brasília/DF, 2017.

MALABARA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M.; LUCENA, C. A. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre, Edipucrs, 603 p, 1998.

MALACARNE, P. F.; MENEZESA, T. N.; NAUMANNA, G. B.; GOMES, H. L.; PIRES, R. G. W.; FIGUEIREDO, S. G.; CAMPOS, F. V. Advances in the characterization of the *Scorpaena plumieri* cytolytic toxin (Sp-CTx). **Toxicon**, p.220-227, 2018.

MONDIN, A. C.; JUNQUEIRA, M. P.; FERREIRA, M. L.; RAMOS, P. R. R. **Peçonhas de bagres marinhos: perfil eletroforético**. In: ENCONTRO REGIONAL DE BIOMEDICINA, 6., 2003, Botucatu, SP. Caderno de Resumos. Botucatu: ERBM., p. 85-85, 2003.

MONDIN, A. C. **Caracterização Toxinológica de Peçonhas do Bagre Marinho *Cathorops spixii* (Ariidae)**. São Paulo, 2007.

MONTEIRO-DOS-SANTOS, J. **Toxicidade da peçonha de arraia de água doce *Potamotrygon cf henlei* (Chondrichthyes Potamotrugonidae) em relação ao sexo e as fases de desenvolvimento ontogenético (jovem e adulto)**. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente), Universidade Federal do Tocantins, PALMAS/TO, 2012.

MONTEIRO-DOS-SANTOS, J. SANTOS, J. C.; MARQUES, E, E.; ARAÚJO, G. C.; SEIBERT, C. S.; LOPES-FERREIRA, M.; CARLA, L. Stingray (*potamotrygon rex*) maturity is associated with inflammatory capacity of the venom. **Toxicon** v. 163, p.74-83, 2019.

MOREIRA, I. S. R; HADDAD JR, V. D. Mapping of the venomous stingrays of the *Potamotrygon* genus in the Tietê River, São Paulo State, Brazil. **Revista Soc Brasileira de Medicina Tropical**. 2022.

MORO, G.; ROSA, R.S.; CHARVET-ALMEIDA, P.. **New record of *Potamotrygon orbigny* Castelanau, 1885 in the Parnaíba river basin, Northwest Brazil**. II Encuentro colombiano sobre Condrictios. Cali., 2010

MOZUMDER, M.M.H. **Antimicrobial Activity in Fish Mucus from Farmed Fish**. Norwegian College of Fishery Science. University of Tromso, Norway, 2005.

MUKHERJEE, A. K. A major phospholipase A2 from *Daboia russelii russelii* venom shows potent anticoagulant action via thrombin inhibition and binding with plasma phospholipids. **Biochimie**. v. 99, p. 153-61, 2014.

MULLER, J. & F. G. J. HENLE. **Systematische Beschreibung der Plagiostomen**. Berlin. 197-198, 1841.

MURAKAMI, M. T. & ARNI, R. K.. A structure based model for liposome disruption and the role of catalytic activity in myotoxic phospholipase A2s. **Toxicon**, 42, 903– 913, 2003.

NASCIMENTO, V.T.; VASCONCELOS, M.A.S.; MACIEL, M.I.S; ALBUQUERQUE, U.P: Famine Foods of Brazil s Seasonal Dry Forests: Ethnobotanical and Nutritional Aspects. **Economic Botany**, v.66, n.1, p.22-34, 2012.

NACHTIGALL, P. G.; LOBODA, T. S. PINHAL, D. Signatures of positive selection in the mitochondrial genome of neotropical freshwater stingrays provide clues about the transition from saltwater to freshwater environment. **Molecular Genetics and Genomics**, 298:229–24. 2023.

NETO, D. G. R. **Arraias de água doce: o animal e sua história ambiental**. Dissertação. Palmas/TO, 2021

NUNES, J.; ALMEIDA, Z.; PIORSKI, N. **Raias capturadas pela pesca artesanal em águas rasas do Maranhão-Brasil**. Arquivos de Ciências do Mar, Fortaleza. v. 38, p. 49-54. 2005.

NURHIKMAH; CHRISTIANUS, A.; SOLAHUDIN, W. M. S. W.; LAU, B. Y. C.; ISMAIL, I. S.; FEI, L. C. Skin Mucus Proteome Analysis Reveals Disease-Resistant

Biomarker Signatures in Hybrid Grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) against *Vibrio alginolyticus*. **Fishes**, 2022.

OLIVEIRA JR., N. G. **Análises transcriptômicas do ferrão de *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon motoro***. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília. 137 p., 2014.

OLIVEIRA JR., N. G.; FERNANDES, G. R.; CARDOSO, M. H.; COSTAL, F. F. CÂNDIDO, E. S.; GARRONE NETO, D. MORTARI, M. R., SCHWARTZ, E. F.; FRANCO, O. L.; ALENCAR, S. A. Venom gland transcriptome analyses of two freshwater stingrays (Myliobatiformes: Potamotrygonidae) from Brazil. **Nature**. 2016.

ONG, L. *et al.* (2016). UV protection in marine fish larvae: The role of fish mucus. *Marine Ecology*, 37(3), 598-605.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS). **Mercurio, Criterios de Salud Ambiental 1**, USA, 1978.

PARK, I. Y.; PARK, C. B.; KIM, M. S.; KIM, S.C. Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurusasotus*. **FEBS Lett.** 437, 258–262, 1998.

PATEL, M.; ASHARF, M. S.; SIDDIQUI, A. J.; ASHARF, S. A.; SACHIDANANDAN, M.; SNOUSSI, M.; ADNAN, M.; HADI, S. **Profiling and Role of Bioactive Molecules from *Puntius sophore* (Freshwater/Brackish Fish) Skin Mucus with Its Potent Antibacterial, Antiadhesion, and Antibiofilm Activities**. **Biomolecules**, 2020.

PANTANO-NETO, J. Estudo preliminar da anatomia descritiva e funcional associada à alimentação em raias de água-doce (*Potamotrygonidae*, Myliobatiformes, Elasmobranchii). p. 92, 2001.

PEDROSO, C. M.; JARED, C.; CHARVET-ALMEIDA, P.; ALMEIDA, M.P.; GARRONE NETO, D.; LIRA, M.S.; HADDAD JR., V.; BARBARO, K.C.; ANTONIAZZI, M. M. Morphological characterization of the venom secretory epidermal cells in the stinger of marine and freshwater stingrays. **Toxicon**, v. 50, p. 688–697, 2007.

RÁDIS-BAPTISTA, G.; KUBO, T.; OGUIURA, N.; PRIETO DA SILVA, A. R. B.; HAYASHI, M. A. F.; OLIVEIRA, E. B.; YAMANE, T. Identificación of crostin, a crotoamine-related gene of *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 43, n.7, p. 751- 759, 2004.

RAJESHKUMAR, R. K.; VENNILA, R.; KARTHIKEYAN, S.; N RAJENDRA PRASAD, N.; ARUMUGAM, M.; VELPANDIAN, T.; BALASUBRAMANIAM, T. Antiproliferative activity of marine stingray *Dasyatis sephen* venom on human cervical carcinoma cell line. **Journal of Venom Animals Toxins Including Tropical Diseases.**, 2015.

RECKZIEGEL, G. C.; DOURADO, F. S.; GARRONE NETO, D. HADDAD JR: Injuries caused by aquatic animals in Brazil: an analysis of the data present in the information system for notifiable diseases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 48(4):460-467, Jul-Aug, 2015.

REVERTER, M; TAPISSIER-BONTEMPS; N. LECCHINI, D.; BANAIGS, B. SASAL, P. Biological and Ecological Roles of External Fish Mucus: A Review. **Fishes**, 2018.

RIBEIRO-NETO, D. G.; SPADACCI-MORENAB, D. D.; MARQUESA, E. E.; SILVA K. L. F.; SEIBERT C. S. Study of the integument that covering back and stinger of the freshwater stingray *Potamotrygon rex* (Chondrichthyes, Potamotrygonidae). **Brazilian Journal of Biology**, vol. 82, 2022.

ROSA, R. S.; CASTELLO, H. P.; THORSON, T. B. *Plesiotrygon iwamae*, a new genus and species of Neotropical freshwater stingray (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Copeia*, p. 447-458, 1987.

ROSA, R. S. **Systematic revision of the South American freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae)**. Tese Doutorado. College of William and Mary, 1985.

ROSA, R. S. *Paratrygon aiereba* (Müller & Henle, 1841): the senior synonym of the freshwater stingray *Disceus thayeri* Garman, 1913 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 7, p. 425-437, 1990.

ROSA, R. S., CHARVETT-ALMEIDA, P., QUIJADA, C. C. D. **Biology of the South American Potamotrygonid stingrays**, in: Carrier, J. C., Musick, J. A., Heithaus, M. R. (Eds.), *Sharks and their relatives II: biodiversity, adaptative physiology and conservation*, 1. ed. CRC Press, United States, pp. 241-286, 2010.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIZAJ, I. Hemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon*, v. 57, p. 627-645, Review, 2011.

SARASQUETE, C.; MUÑOZ-CUETO, J.A., & RUIZ-JARABO, I. Distribution and characterization of mucous cells in the digestive tract of the Senegalese sole *Solea senegalensis*. *Histology and Histopathology*, 15(1), 143-151, 2000.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.

SILVA, J. B. C. P.: **Revisão taxonômica e morfológica do complexo *Potamotrygon orbignyi* (Castelnaud, 1855) (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae)**. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, 2009.

SILVA, F.; HUANG, Y.; YANG, V.; MU, X.; SHI, Q.; ANTUNES, A. Transcriptomic Characterization of the South American Freshwater Stingray *Potamotrygon motoro* Venom Apparatus. **Toxins**, p.02-19., 2018.

SHEPARD, K. L. (1994). Functions for fish mucus. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4(4), 401-429.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1488, p. 1-19, 2000.

SOLANI, F. M. B. **Avaliação da neutralização de importantes atividades tóxicas induzidas pelos principais peixes peçonhentos brasileiros por um soro poliespecífico produzido em murinos**. São Paulo, 2008.

SU, Y. Isolation and identification of pelteobagrin, a novel antimicrobial peptide from the skin mucus of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part B Biochem. Mol. Biol. 158, 149–154, 2011.

SUBRAMANIAN, S.; ROSS, N. W.; MACKINNON, S. L. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 148(3), 256-263, 2007.

SUBRAMANIAN, S.; ROSS, N. W.; MACKINNON, S. L. Myxinidin, A Novel Antimicrobial Peptide from the Epidermal Mucus of Hagfish, *Myxine glutinosa* L. **Marine Biotechnology**. 11, 748, 2009.

TAKEDA, A.M.; FUJITA, D.S. **Benthic invertebrates**. In: THOMAZ, S.M. et al. **The upper Paraná river: physical aspects, ecology and conservation**. Leiden: Backhuys Publishers, p. 191-207, 2004.

TANG, J. Y., BULLEN, N. P., AHMAD, S., & WHITNEY J. C. (2018). Diverse NADase effector families mediate interbacterial antagonism via the type VI secretion system. *Journal of Biological Chemistry*, 293(37), 1504-1514.

THOMSON, M.; ASSAD, H.; AL-HASSAN, J. M.; CRIDDLE. Tyrosine specific sterase activity in the epidermal secretions of the Arabian Gulf catfish, *Arius bilineatus* (Valenciennes). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 93B, p. 621-627, 1989

THOMSON, M.; ASSAD, H.; AL-HASSAN, J. M.; CRIDDLE, R. S. An acid phosphatase secreted from the skin of the Arabian Gulf catfish, *Arius bilineatus*. *FASEB J.* 4, A2234, 1990.

THULESIUS, O.; AL-HASSAN, J. M.; CRIDDLE, R. S.; THOMSON, M. **Vascular responses elicited by venom of Arabian catfish (*Arius thalassinus*)**. *Gen. Pharmacol.*, v. 14, p. 129-132, 1983.

TURIBIO, T.O. **Caracterização bioquímica do muco epidérmico da arraia de água doce *Paratrygon aiereba***. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), São Paulo, 2018.

THOMAZI, G. O. C; COSTA, A.; RODRIGUES, J. P.; ALVES, G. J. ; NETO, J. P .P; TURIBIO, T. O.; ROCHA, A. M.; AIRES, R. S.; SEIBERT, C. S.; SPANCER, P. J.; JÚNIOR, G. J.; JÚNIOR, H. F. A.; NASCIMENTO, N. *Paratrygon aiereba* irradiated anti-mucus serum reduce edematogenic activity induced in experimental model. **Toxicon**, 2020.

THORSON, T. B.; WOOTON, R. M. & GEORGI, T. D. 1978. Rectal gland of freshwater stingrays, *Potamotrygon* spp. (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). **The Biological Bulletin**, 154:508-516.

THORSON, T. B.; LANGHAMMER, J. K.; OETINGER, M. I. Periodic shedding and replacement of venomous caudal spines, with special reference to South American freshwater stingrays, *Potamotrygon* spp. **Environmental biology of fishes**. v. 23, n. 4, p. 299-314. 1988.

VENNILA, R.; KUMAR, K. R.; KANCHANA, S.; ARUMUGAM, M.; VIJAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAM, T. Preliminary investigation on antimicrobial and proteolytic property of the epidermal mucus secretion of marine stingrays. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, Supplement, p. S239- S243, 2011.

WEISS, B. F.; WOLFENDEN, H. D. Survivor of a stingray injury to the heart. **Medical journal of Australia**, v. 175, n. 1, p. 33-34, 2001.

WHYTE, S. K. The innate immune response of finfish—A review of current knowledge. *Fish & Shellfish Immunology*, 23(6), 1127-1151, 2007.

ZHAO, X.; FINDLY, R. C.; DICKERSON, H. W. Cutaneous antibody-secreting cells and B cells in a teleost fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 32, n. 5, p. 500-508, 2008.

ZHANG, Z., *et al.* (2015). The chemosensory function of the fish mucus layer. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(3), 537-549.

ZOU, J.; MERCIER, C.; KOUSSOUNADIS, A.; SECOMBES, C. Discovery of multiple beta-defensin like homologues in teleost fish. **Molecular Immunology**. 44, 638-647, 2007.